



---

**Universidad de Valladolid**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA E INMUNOLOGÍA**

**LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA DE LAS MUCOSAS**

TESIS DOCTORAL:

**Linfocitos Intraepiteliales y Células  
Dendríticas: Distribución y utilidad  
en el diagnóstico y en la  
modulación de la respuesta  
inmunitaria intestinal**

Presentada por D. Enrique Montalvillo Álvarez  
para optar al grado de  
doctor por la Universidad de Valladolid

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









# INDEX

## Abbreviation list

<b>SUMMARY</b> .....	<b>1</b>
<b>1.- INTRODUCTION</b> .....	<b>11</b>
<b>1.1. Gut-associated lymphoid tissue</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1A. Inductive tissue: Peyer's patches and mesenteric lymph nodes</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1B. Effector tissue: lamina propria and intestinal epithelium</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1B.1. Lamina propria: Dendritic cells</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1B.2. Intestinal epithelium: Intraepithelial lymphocytes</b> .....	<b>19</b>
<b>1.2. Lymphoid cell populations in the intestinal mucosa</b> .....	<b>22</b>
<b>1.2A.1. TCR<math>\alpha\beta</math> cells</b> .....	<b>22</b>
<b>1.2A.2. T<math>\gamma\delta</math> cells</b> .....	<b>23</b>
<b>1.2A.3. Regulatory T cells</b> .....	<b>24</b>
<b>1.2A.4. B cells</b> .....	<b>25</b>
<b>1.2A.5. Natural Killer cells</b> .....	<b>25</b>
<b>1.2A.6. Natural Killer T cells</b> .....	<b>26</b>
<b>1.2A.7. Invariant NKT cells</b> .....	<b>28</b>
<b>1.3. iNKT cells in the human bowel</b> .....	<b>30</b>
<b>1.3A. The role of iNKT cells in intestinal diseases</b> .....	<b>32</b>
<b>1.4. Major human intestinal inflammatory diseases</b> .....	<b>33</b>
<b>1.4A. Inflammatory bowel disease</b> .....	<b>33</b>
<b>1.4A.1. Inflammatory bowel disease immunopathogenesis</b> .....	<b>34</b>
<b>1.4B. Celiac disease</b> .....	<b>37</b>
<b>1.4B.1. Celiac disease immunopathogenesis</b> .....	<b>38</b>
<b>1.4B.1.1. Innate immune response to gluten</b> .....	<b>39</b>
<b>1.4B.1.2. Adaptive immune response to gluten</b> .....	<b>40</b>
<b>1.4B.1.3. Changes of the cytokine network in celiac disease</b> ..	<b>43</b>
<b>1.4B.2. The immunology in the diagnosis and monitoring of celiac disease</b> .....	<b>44</b>
<b>1.4B.3. New tools in the diagnosis of celiac disease: Immunophenotyping by flow cytometry, the intraepithelial lymphogram</b> .....	<b>47</b>
<b>1.4B.4. Development of new therapies in celiac disease</b> .....	<b>48</b>
<b>1.4B.5. New immunotherapy based in the glycosilation of gliadin-derived peptides involved in celiac disease pathogenesis</b> .....	<b>50</b>
<b>2.- JUSTIFICATION</b> .....	<b>55</b>
<b>3.- OBJECTIVES</b> .....	<b>61</b>

<b>4.- MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>65</b>
4.1. Patients and collection of biological samples.....	67
4.2. Isolation of intraepithelial lymphocytes and lamina propria leukocytes from intestinal biopsy.....	70
4.3. Biopsy culture.....	71
4.4. Isolation of peripheral blood mononuclear cells.....	71
4.5. Obtaining dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells and monocyte-derived.....	72
4.6. Preparation of gliadin peptides and glycosylation of the deamidated 33mer peptide.....	73
4.7. Conditioning of dendritic cells with gliadin-derived peptides and deamidated 33mer glycans.....	77
4.8. Magnetic isolation and CFSE labeling of peripheral blood T cells.....	78
4.9. Autologous and heterologous T cell proliferation assays.....	79
4.10. Cell staining and study of surface markers by flow cytometry .....	80
4.11. Flow cytometric analysis of intracellular cytokines produced by T cells in autologous lymphoproliferative assays.....	81
4.12. Extraction of RNA from cells and biopsy explants.....	83
4.13. Reverse transcriptase PCR and quantitative PCR.....	83
4.14. Analysis by ELISA of the specificity of glycopeptides obtained after sortase A reaction and the cytokine production by stimulated dendritic cells with these glycopeptides.....	85
4.15. Uptake and binding assays of the deamidated 33mer peptide-derived glycopeptides to peripheral blood mononuclear cells.....	86
4.16. Expression of DC-SIGN in duodenal biopsies by fluorescence microscopy.....	87
4.17. Statistical analysis of the results.....	87
<b>5.- RESULTS.....</b>	<b>89</b>
5.1. Distribution of intraepithelial lymphocytes along the gut.....	91
5.1A. Variations of intraepithelial lymphocytes in the small bowel of healthy individuals.....	91
5.1B. Differences within the intraepithelial lymphocyte populations and gut homing ligands expression between the right and left colon of healthy individuals.....	92
5.1C. Variations within the intraepithelial lymphocyte populations in the duodenum of patients with celiac disease.....	95
5.2. Increased intraepithelial V $\alpha$ 24 <sup>+</sup> invariant NKT cells in the celiac duodenum.....	98
5.2A. Increased duodenal V $\alpha$ 24 mRNA expression in celiac disease patients.....	98
5.2B. Duodenal V $\alpha$ 24 mRNA expression in celiac disease correlates with IFN $\gamma$ in both resting and after <i>in vitro</i> gliadin challenge.....	100
5.2C. Duodenal V $\alpha$ 24 and FoxP3 mRNA levels reveal a celiac disease molecular profile.....	102

<b>5.2D.</b> Increased intraepithelial iNKT cells in celiac disease patients and correlation with V $\alpha$ 24 mRNA expression.....	103
<b>5.3.</b> Increased number of intraepithelial NK-like cells in the intestinal mucosa affected by Crohn’s disease.....	104
<b>5.4.</b> Study of the immunogenic effect of the 8mer gliadin-derived peptide in an <i>in vitro</i> peripheral blood dendritic cells culture model and an autologous lymphoproliferative assay.....	108
<b>5.4A.</b> The deamidated 8mer peptide induces the activation of dendritic cells <i>in vitro</i> .....	109
<b>5.4B.</b> The deamidated 8mer peptide induces a profile of pro-inflammatory cytokines production in dendritic cells <i>in vitro</i> .....	110
<b>5.4C.</b> The deamidated 8mer peptide induces the proliferation of IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T cells in an autologous lymphoproliferative assay.....	113
<b>5.5.</b> Modulation of the immune response induced by gluten in celiac disease by glycosylation of the deamidated 33mer peptide.....	115
<b>5.5A.</b> Increased number of DC-SIGN <sup>+</sup> cells in the lamina propria of untreated celiac disease patients.....	115
<b>5.5B.</b> The different glycopeptides obtained by the glycosilation of deamidated 33mer peptide do not produce maturation or activation of immature dendritic cells.....	118
<b>5.5C.</b> mRNA expression levels of IL-10, IL-6 and TGF $\beta$ in monocyte-derived dendritic cells stimulated with different glycopeptides of the deamidated 33mer peptide.....	120
<b>5.5D.</b> Protein secretion levels of IL-10, IL-6, IL-12p70, TGF $\beta$ and IL-1 $\beta$ in the culture supernatant of monocyte-derived dendritic cells stimulated with different glycopeptides of the deamidated 33mer peptide.....	122
<b>5.5E.</b> The deamidated 33mer peptide glycans in a dendrimeric arrangement are captured only by dendritic cells.....	125
<b>5.5F.</b> The stimulated dendritic cells with the different deamidated 33mer peptide glycans are not able to induce a lymphoproliferative response.....	127
<b>6.- DISCUSSION.....</b>	<b>129</b>
<b>7.- CONCLUSIONS.....</b>	<b>153</b>
<b>8.- REFERENCES.....</b>	<b>159</b>



# INDICE:

## Listado de abreviaturas

<b>SUMMARY / RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1. Tejido linfoide asociado al intestino.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1A. Tejido de inducción: Placas de Peyer y folículos linfoides mesentéricos.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1B. Tejidos efectores: lamina propia mucosa y epitelio intestinal.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1B.1. Lamina propia mucosa: Células dendríticas.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1B.2. Epitelio intestinal: Linfocitos intraepiteliales.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2. Poblaciones celulares linfoides en la mucosa intestinal.....</b>	<b>22</b>
<b>1.2A.1. Linfocitos TCR<math>\alpha\beta</math>.....</b>	<b>22</b>
<b>1.2A.2. Linfocitos T<math>\gamma\delta</math>.....</b>	<b>23</b>
<b>1.2A.3. Linfocitos T reguladores.....</b>	<b>24</b>
<b>1.2A.4. Linfocitos B.....</b>	<b>25</b>
<b>1.2A.5. Células <i>Natural Killer</i>.....</b>	<b>25</b>
<b>1.2A.6. Células T <i>Natural Killer</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>1.2A.7. Células NKT invariantes.....</b>	<b>28</b>
<b>1.3. Células iNKT en el intestino humano.....</b>	<b>30</b>
<b>1.3A. Papel de las células iNKT en la patología intestinal.....</b>	<b>32</b>
<b>1.4. Principales enfermedades inflamatorias intestinales en humanos.....</b>	<b>33</b>
<b>1.4A. Enfermedad Inflamatoria Intestinal.....</b>	<b>33</b>
<b>1.4A.1. Inmunopatogenia de la Enfermedad Inflamatoria intestinal.....</b>	<b>34</b>
<b>1.4B. Enfermedad Celíaca.....</b>	<b>37</b>
<b>1.4B.1. Inmunopatogenia de la Enfermedad Celíaca.....</b>	<b>38</b>
<b>1.4B.1.1. Inmunidad innata frente al gluten.....</b>	<b>39</b>
<b>1.4B.1.2. Respuesta inmunitaria adaptativa frente al gluten.....</b>	<b>40</b>
<b>1.4B.1.3. Alteración de la red de citocinas en la enfermedad celíaca.....</b>	<b>43</b>
<b>1.4B.2. La inmunología en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad celíaca.....</b>	<b>44</b>
<b>1.4B.3. Nuevas técnicas en el diagnóstico de la enfermedad celíaca: Inmunofenotipaje por citometría de flujo, el linfograma intraepitelial.....</b>	<b>47</b>
<b>1.4B.4. Desarrollo de nuevas terapias en la enfermedad celíaca.....</b>	<b>48</b>
<b>1.4B.5. Nueva inmunoterapia basada en la glicosilación de los péptidos derivados de la gliadina implicados en la patogenia celíaca.....</b>	<b>50</b>
<b>2.- JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>55</b>
<b>3.- OBJETIVOS.....</b>	<b>61</b>

<b>4.- MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>65</b>
4.1. Pacientes y obtención de muestras biológicas.....	67
4.2. Aislamiento de linfocitos intraepiteliales y de leucocitos de lamina propia mucosa a partir de biopsia intestinal.....	70
4.3. Cultivo de explantes de biopsia.....	71
4.4. Aislamiento y purificación de células mononucleares de sangre periférica.....	71
4.5. Obtención de células dendríticas a partir de células mononucleares de sangre periférica y derivadas de monocitos.....	72
4.6. Preparación de péptidos de la gliadina y glicosilación del péptido 33mer desaminado.....	73
4.7. Estimulación de células dendríticas con péptidos derivados de la gliadina y con compuestos glicosilados del péptido 33mer desaminado.....	77
4.8. Obtención, separación magnética y marcaje con CFSE de linfocitos T de sangre periférica.....	78
4.9. Ensayos de proliferación de linfocitos T autólogo y heterólogo.....	79
4.10. Tinción celular y estudio de marcadores de superficie por citometría de flujo.....	80
4.11. Análisis por citometría de flujo de citocinas intracitoplasmáticas producidas por linfocitos T en los ensayos de linfoproliferación autólogos.....	81
4.12. Extracción de ARN de células y de explantes de biopsia.....	83
4.13. PCR de retrotranscripción y PCR cuantitativa.....	83
4.14. Análisis de la especificidad de los glicopéptidos obtenidos tras la reacción de la sortasa A y de la producción de citocinas por células dendríticas estimuladas con los glicopéptidos, mediante la técnica ELISA.....	85
4.15. Ensayos de captación y unión de los glicopéptidos derivados del péptido 33mer desaminado a células mononucleares de sangre periférica.....	86
4.16. Expresión de DC-SIGN en biopsias duodenales mediante microscopía de fluorescencia.....	87
4.17. Análisis estadístico de los resultados.....	87
<b>5.- RESULTADOS.....</b>	<b>89</b>
5.1. Distribución de los linfocitos intraepiteliales a lo largo del intestino.....	91
5.1A. Variaciones de los linfocitos intraepiteliales en el intestino delgado de individuos sanos.....	91
5.1B. Diferencias en las poblaciones de linfocitos intraepiteliales y en la expresión de ligandos de marcadores de migración intestinal entre el colon derecho y el colon izquierdo de individuos sanos.....	92
5.1C. Variaciones de las subpoblaciones de linfocitos intraepiteliales en el duodeno de pacientes con enfermedad celíaca.....	95
5.2. Aumento de células $V\alpha 24^+$ NKT invariantes en el duodeno celíaco.....	98
5.2A. Incremento de la expresión de ARNm de $V\alpha 24$ en los pacientes celíacos.....	98
5.2B. La expresión de ARNm de $V\alpha 24$ en el duodeno de pacientes celíacos se correlaciona con los niveles de $IFN\gamma$ tanto en biopsias en fresco como tras estimulación <i>in vitro</i> en biopsias de pacientes en dieta sin gluten.....	100

<b>5.2C.</b> La expresión de ARNm de V $\alpha$ 24 y FoxP3 en el duodeno revelan un perfil molecular propio de enfermedad celíaca.....	102
<b>5.2D.</b> Incremento del número de células iNKT intraepiteliales en pacientes celíacos y su correlación con los niveles de expresión de ARNm de V $\alpha$ 24.....	103
<b>5.3.</b> Aumento de la población de células NK- <i>like</i> intraepiteliales en la mucosa intestinal afectada por la enfermedad de Crohn.....	104
<b>5.4.</b> Estudio del efecto inmunogénico del péptido derivado de la gliadina 8mer en un modelo de células dendríticas de sangre periférica y linfoproliferativo autólogo.....	108
<b>5.4A.</b> El péptido desaminado 8mer produce la activación de células dendríticas <i>in vitro</i> .....	109
<b>5.4B.</b> El péptido desaminado 8mer induce <i>in vitro</i> un perfil de producción de citocinas pro-inflamatorio en las células dendríticas.....	110
<b>5.4C.</b> El péptido desaminado 8mer induce la proliferación de linfocitos T productores de IFN $\gamma$ en ensayos de linfoproliferación autólogos.....	113
<b>5.5.</b> Modulación de la respuesta inmunitaria inducida por el gluten en la enfermedad celíaca mediante la glicosilación del péptido 33mer desaminado.....	115
<b>5.5A.</b> Aumento del número de células DC-SIGN <sup>+</sup> en la lamina propia de pacientes celíacos en actividad.....	115
<b>5.5B.</b> Los diferentes glicopéptidos derivados de la glicosilación del péptido 33mer desaminado no producen maduración ni activación de células dendríticas inmaduras.....	118
<b>5.5C.</b> Niveles de expresión de ARNm de IL-10, IL-6 y TGF $\beta$ en células dendríticas derivadas de monocitos estimuladas con los diferentes glicopéptidos del péptido 33mer desaminado.....	120
<b>5.5D.</b> Niveles de secreción de proteína de IL-10, IL-6, IL-12p70, TGF $\beta$ e IL-1 $\beta$ en el sobrenadante del cultivo de células dendríticas derivadas de monocitos estimuladas con los diferentes glicopéptidos del péptido 33mer desaminado.....	122
<b>5.5E.</b> Los glicopéptidos dendriméricos derivados del péptido 33mer desaminado son captados únicamente por células dendríticas.....	125
<b>5.5F.</b> Las células dendríticas estimuladas con los diferentes glicopéptidos derivados de la glicosilación del péptido 33mer desaminado no son capaces de inducir una respuesta linfoproliferativa.....	127
<b>6.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>129</b>
<b>7.- CONCLUSIONS / CONCLUSIONES.....</b>	<b>153</b>
<b>8.- REFERENCIAS.....</b>	<b>159</b>



## Listado de abreviaturas

- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- ADNc:** ácido desoxirribonucleico complementario
- pANCA:** anticuerpo anti-neutrófilos
- APC:** aloficocianina
- ARN:** ácido ribonucleico
- ARNm:** ácido ribonucleico mensajero
- ASB:** albúmina sérica bovina
- ASCA:** anticuerpo anti-*Saccharomyces cerevisiae*
- CARD15:** dominio reclutador de caspasa 15. *Caspase recruitment domain 15*
- CCL:** ligando de quimiocina. *Chemokine (C-C) motif ligand*
- CCR:** receptor de quimiocina. *C-C chemokine receptor*
- CD:** célula dendrítica
- CDi:** célula dendrítica inmadura
- CDmo:** célula dendrítica derivada de monocito
- CEI:** célula epitelial intestinal
- CFSE:** ester succinimidil diacetato carboxifluoresceina. *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*
- CLI:** célula linfoide innata
- CLR:** receptor de lectina de tipo C. *"C" type lectin receptor*
- CMSP:** célula mononuclear de sangre periférica
- CPA:** célula presentadora de antígeno
- CU:** colitis ulcerosa
- DAPI:** 4', 6-diamino-2-fenilindol
- DC-SIGN:** receptor no-integrina que acapara la molécula de adhesión intercelular (ICAM)-3 específica de células dendríticas. *DC-specific intracellular adhesion molecule (ICAM)-3 grabbing non-integrin*
- DN:** doble negativa
- DRC:** dominio de reconocimiento de carbohidratos
- DSE:** dominio subepitelial
- DSG:** dieta sin gluten
- DTT:** dithiothreitol

**EAF:** epitelio asociado al folículo

**EC:** enfermedad celíaca

**ECr:** enfermedad de Crohn

**ECR:** enfermedad celíaca refractaria

**EDTA:** ácido etilendiaminetetraacético. *Ethylenediaminetetraacetic*

**EEM:** error estándar de la media

**EGFR:** receptor del factor de crecimiento epidérmico. *Epidermal growth factor receptor*

**EII:** enfermedad inflamatoria intestinal

**ELISA:** enzimoimmunoanálisis. *Enzyme-linked immunosorbent assay*

**ESG:** enteropatía sensible al gluten

**FITC:** fluoresceína

**FLM:** folículo linfoide mesentérico

**FoxP3:** factor de transcripción *forhead box P3*

**GADPH:** gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

**αGalCer:** α-Galactosilceramida

**GM-CSF:** factor estimulador de colonias de monocitos y macrófagos. *Granulocyte macrophage colony-stimulation factor*

**GSL:** glicoesfingolípido

**HBSS:** solución salina balanceada de Hank. *Hank's balanced salt solution*

**HLA-DR:** receptor de antígeno leucocitario humano. *Human leukocyte antigen receptor*

**HPLC:** cromatografía líquida de alta eficiencia. *High performance liquid chromatography*

**iGb3:** isoglobotrihexosilceramida

**ICAM:** molécula de adhesión intercelular. *Intracellular adhesion molecule*

**IFN:** interferon

**Ig:** inmunoglobulina

**IL:** interleuquina

**IMF:** intensidad media de fluorescencia

**LIE:** linfocito intraepitelial

**LLP:** leucocito de la lamina propia

**LP:** lamina propia

**LPS:** lipopolisacárido

**LT $\beta$ R:** receptor de linfotoxinas- $\beta$ . *Lymphotoxin- $\beta$  receptor*

**LTi:** célula inductora de tejido linfoide. *Lymphoid tissue-inducer cell*

**$\alpha$ ManCer:**  $\alpha$ -Manosilceramida

**MC:** medio de cultivo completo (suplementado)

**MHC:** complejo mayor de histocompatibilidad. *Major histocompatibility complex*

**NF- $\kappa$ B:** factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

**NK:** célula citolítica natural. *Natural killer cell*

**NKT:** célula T *natural killer*

**iNKT:** célula T *natural killer* invariante

**mNKT:** célula T *natural killer* de mucosa

**vNKT:** célula T *natural killer* variable

**xNKT:** célula NKT-like

**NOD2:** dominio de oligomerización por unión de nucleótidos que contiene la proteína  
*2. Nucleotide oligomerization domain 2*

**iNOS:** óxido nítrico sintasa inducible

**OCT:** componente de temperatura para corte óptimo. *Optimal cutting temperature compound*

**PAMAM:** dendrímero Poli-AmidoAminado

**PBS:** tampón salino fosfato. *Phosphate buffered saline*

**qPCR:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa. *Quantitative polymerase chain reaction*

**PE:** ficoeritrina

**PE-Cy7:** ficoeritrina-cianina-7

**PFA:** paraformaldehído

**PHA:** fitohemaglutinina. *Phytohaemagglutinin*

**PMA:** acetato de forbol miristato. *Phorbol myristate acetate*

**PP:** placa de Peyer

**PPAR $\gamma$ :** receptor de glitazona. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

**RIQ:** rango intercuartil

**ROC:** *receiver operating characteristic curve analysis*

**RRP:** receptor de reconocimiento de patrones

**RT-PCR:** PCR de retrotranscripción

**SFB:** suero fetal bovino

**TA:** temperatura ambiente

**Tc:** linfocito T citotóxico

**TCR:** receptor de células T. *T cell receptor*

**TG2:** transglutaminasa tisular

**TGF $\beta$ :** factor transformante de crecimiento beta. *Transforming growth factor beta*

**Th:** linfocito T cooperador. *T helper cell*

**TLAI:** tejido linfoide asociado al intestino

**TLR:** receptor *toll-like*. *Toll-like receptor*

**TMB:** tetrametilbencidina

**TNF:** factor de necrosis tumoral. *Tumor necrosis factor*

**Treg:** célula T reguladora

**TSLP:** linfopoyetina estromal tímica. *Thymic stromal lymphopietin*

**UDG:** uracil DNA glicosilasa

**UFC:** unidades de fluorescencia de centelleo



# **SUMMARY / RESUMEN**

---



## SUMMARY

The gut is the largest and complex immune organ of the human body. It is under constant stimulation with both dietary antigens and commensal bacterial flora, such as opportunistic pathogens. Because of this, the intestinal mucosa requires a non-specific quick response to maintain intestinal homeostasis and to protect the organism from pathogen entry. This response depends on the innate immunity complemented by the mechanisms of oral tolerance. The main immune cell populations responsible for maintaining the homeostasis are the intraepithelial lymphocytes (IELs) and the lamina propria (LP) cells. The latter include dendritic cells (DCs), the more potent antigen presenting cells in the gut.

The IELs are an unconventional and heterogeneous population, consisting mainly of  $T\alpha\beta$ ,  $T\gamma\delta$  cells and natural killer (NK) cells, which are interspersed between enterocytes. Its uniqueness in terms of location, development, specificity to recognize non-pathogenic and potentially pathogenic antigens, and their functional specialization with characteristics between innate and adaptive immunity, allows these effector cells to be the first defensive barrier in an organ with a large antigenic load, and protects the integrity of the mucosal barrier. However, their activated condition in pro-inflammatory environments suggests that these populations may help to initiate and/or exacerbate a pathological response, as occurs in inflammatory bowel disease (IBD) and celiac disease (CD). Our research laboratory has been engaged for years in the study of the immunopathogenic mechanisms responsible for inflammatory bowel disease, in this case focusing on the role that the IELs can play in the development of these processes.

Many authors have described an increased number of IELs with a decreased proportion of NK-like cells in the duodenal mucosa of celiac disease patients. Within the IELs, it has been highlighted the increase of the  $T\gamma\delta$  cell population which remains elevated even after gluten exclusion. The initial diagnosis of CD is usually performed by detecting anti-TG2 antibodies in blood plasma. The confirmation of the diagnosis is based on the causal demonstration between the intake of gluten and the characteristic enteropathy of the disease, considering the pathological examination of the biopsy as the gold standard. However, the alterations observed in the mucosa are not pathognomonic of CD, and these can be also observed in other intestinal diseases. This lack of morphological changes in biopsy makes the study of quantitative variations described for the IEL population by flow cytometry an useful tool for the diagnosis of the disease. Therefore, we aimed to validate this technique in our population. According to the results presented in this thesis, the combined analysis of the three IEL populations studied (increased number of total IELs, decreased of NK-like cells and increased proportion of  $T\gamma\delta$  cells) gives the highest specificity and sensitivity in the diagnostic protocol for CD. The percentages obtained for these IEL subpopulations in all patient groups studied were very similar to those reported by other groups, which allowed us to validate this method as a useful tool for the diagnosis of CD with a beneficial application in the clinical practice.

The involvement of IELs in CD pathogenesis seems clear and well documented. However, it does not occur the same in IBD. The immune response that occurs in IBD is characterized by an enriched pro-inflammatory cytokine environment, predominantly IL-23, which is involved in the development, activation and survival of different populations of IELs. Liu et al. recently demonstrated that IELs isolated from patients with IBD had higher cytolytic capacity against epithelial cells. All of this may suggest a direct involvement of the IELs in IBD. Nonetheless, the role of IELs in the immunopathogenic mechanisms of IBD is not well known. The study of variations within these populations can lead to a better understanding of the disease and the development of a new diagnostic tool. Therefore, we aimed to explore whether the intestinal mucosa affected by Crohn's disease (ECr) and ulcerative colitis (UC) showed changes in the normal distribution of IEL populations and whether the analysis of these changes by flow cytometry was useful in the differential diagnosis between both entities and with other gastrointestinal inflammatory diseases. Our results showed that the mucosa affected by ECr, independently of the origin of tissue sample either from the colon or ileum, have a higher number of NK-like cells compared to other groups.

While CD only affects to duodenal mucosa, the large intestine is the main tissue target of ECr and CU. The IEL populations are differently distributed in the epithelium of the small and large intestine. This pattern of distribution is probably influenced by the distinct digestive functions and the physiological conditions in each section. However, the colon has always been considered as a single section from the anatomical and functional point of view. Recent studies have shown that the proximal and distal colon have different embryological origin, vascularization and lymphatic drainage, as well as enzyme activity. Within the epithelial compartment, it has been found that the epithelial cells of the proximal and distal colon differ in their gene expression profile. Therefore we aimed to establish the normal values for IEL subpopulations in the intestinal mucosa by flow cytometry, and to study whether the distribution of these populations varies along the digestive tract. According to our results, the intraepithelial compartment of the ileum showed an increased number of T cells, with a higher proportion of CD8<sup>+</sup> T cells and a decreased NK-like population, compared to the duodenum. As far as the large intestine is concerned, the distal colonic epithelium from healthy individuals showed an increase number of T $\gamma\delta$  lymphocytes and NK-like cells compared to the proximal colon, as well as CD4<sup>+</sup> T cells. Differences between both sections of the colon may be explained by changes in the mucosal expression of gut homing ligands.

The intestinal intraepithelial compartment also includes invariant natural killer T (iNKT) cells, with innate and adaptive characteristics and probably involved in oral tolerance. However, quantitative and/or functional alterations of this subpopulation may favor the development of various diseases such as IBD or CD. Different studies of circulating and duodenal iNKT cells in celiac patients have yielded conflicting results. Up to date, there is consensus on neither the number of iNKT cells in the duodenum of

celiac patients, nor on their involvement in the pathogenesis of the disease. In this thesis, we aimed to study the percentage of the iNKT cells in the duodenal epithelium from celiac patients, and whether changes in this population may be involved in the pathogenic response that occurs in the mucosa. Our results showed an increased number of iNKT cells in the duodenum of both untreated and treated CD patients, irrespective of the mucosal status. Increased mRNA levels of V $\alpha$ 24 correlated with the severity of the mucosal lesion and with IFN $\gamma$  mRNA levels, in both resting conditions and following *in vitro* gliadin challenge. A CD-like molecular profile, defined by an increased mRNA expression of V $\alpha$ 24 together with a decreased expression of FoxP3, may represent a pro-inflammatory signature of the duodenum in CD.

As previously mentioned, another cell population involved in the oral tolerance and the innate immune response are DCs. These cells are able to respond quickly and efficiently to the local microenvironment, which gives them the ability to control the immune system and the balance between inflammation and oral tolerance. However, these cells are also implicated in CD pathogenesis, being a key factor in the adaptive immune response to gluten. Dendritic cells express C-type lectin receptors or CLRs, especially DC-SIGN. Endogenous ligands for DC-SIGN, with a high content of carbohydrate, trigger certain mechanisms involved in intestinal homeostasis. DC-SIGN is also involved in differentiation events, reprogramming and expression of certain genes encoding cytokines that influence the final phenotype and activity of DCs. Since DCs are a major component of the immune response in CD, signaling through DC-SIGN may have a direct effect on the modulation of the immune response to gluten, so we studied the expression of this receptor in the duodenal mucosa. An increased expression of DC-SIGN in lamina propria cells was observed in untreated celiac patients compared with the remaining individuals. All DC-SIGN<sup>+</sup> cells were HLA-DR<sup>+</sup> and therefore, these were antigen presenting cells. The modulation of the immune response using specific ligands of DC-SIGN as a vehicle for immunogens may be a good therapeutic strategy for this disease

One of the main peptides that have been identified with the ability of triggering the adaptive response is the immunodominant peptide p57-89 of the  $\alpha$ -gliadin (33mer). Therefore, part of our work has focused on the glycosylation of the 33mer in order to modulate the immune response induced by the native peptide, through signaling mediated by DC-SIGN<sup>+</sup> DCs. To summarize our results, deamidated 33mer peptide glycans in a dendrimeric arrangement with specific endogenous ligand of DC-SIGN, such as Lewis type carbohydrates, are captured only by dendritic cells, which then decrease the production of pro-inflammatory cytokines probably leading to the modulation of the immune response to gluten in the duodenum of celiac patients.

The adaptive immune response against gluten in celiac disease patients, mediated by CD, includes also an humoral response produced by B lymphocytes. Gluten specific T cells in the context of a Th2 cytokine profile induce B cell proliferation and differentiation into plasma cells which produce antibodies against deamidated gliadin peptides and TG2. In this context, our group identified, for the first

time to our knowledge, plasma CD-specific IgA antibodies that recognize as the specific antigen a novel deamidated gliadin peptide (FPLQPEQP), derived from an 8mer peptide (FPLQPQQP) generated during duodenal degradation of gliadin by CD-specific duodenal proteases. Therefore, we decided to investigate the immunogenic effect of this 8mer peptide by using an *in vitro* peripheral blood DCs culture model and an autologous lymphoproliferative assay. The results obtained in this thesis show that the deamidated 8mer peptide is able to stimulate a pro-inflammatory immune response, through activation/maturation of dendritic cells with a complex profile of cytokine production, which include IL-4, IL-6 and TGF $\beta$ , and the proliferation of IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T cells is independent of whether antigen presentation is mediated by HLA-DQ2<sup>+</sup> or DQ2<sup>-</sup> DCs.

## RESUMEN

El intestino representa el órgano inmunitario más grande y complejo que existe, sometido a una estimulación constante durante toda la vida tanto por antígenos de la dieta y flora bacteriana comensal, como por microorganismos patógenos oportunistas. Debido a esto, la mucosa intestinal requiere una respuesta rápida aunque inespecífica para mantener la homeostasis intestinal y proteger al organismo de la entrada de patógenos en caso de que sea necesario. Esta respuesta depende de la inmunidad innata que se complementa con los mecanismos de tolerancia oral. Las principales poblaciones del sistema inmunitario encargadas de mantener la homeostasis son los linfocitos intraepiteliales (LIE) y las poblaciones de la lamina propia (LP). Entre estas últimas destacan las células dendríticas (CD) gracias a que son las células presentadoras de antígeno profesionales más potentes que existen.

Los LIE son una población heterogénea y peculiar, compuesta sobre todo por células  $T\alpha\beta$ ,  $T\gamma\delta$  y células *natural killer* (NK), que se encuentran intercalados entre los enterocitos. Su singularidad, en cuanto a su ubicación, sus vías de desarrollo, su especificidad para reconocer antígenos propios y potencialmente patogénicos, y su especialización funcional con características entre la inmunidad innata y adaptativa, permite a estas células efectoras ser la primera barrera defensiva en un órgano con una gran carga antigénica, además de proteger la integridad de la barrera mucosa. Sin embargo, su estado activado en ambientes pro-inflamatorios sugiere que estas poblaciones pueden contribuir a iniciar y/o exacerbar una respuesta patológica, como ocurre en la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y la enfermedad celíaca (EC). Nuestro laboratorio de investigación se ha dedicado a lo largo de su trayectoria al estudio de los diferentes mecanismos inmunopatogénicos responsables de estas patologías intestinales, centrándonos en este caso en el papel que pueden tener los LIE en el desarrollo de las enfermedades intestinales inflamatorias.

Muchos autores han descrito un aumento de los LIE respecto a las células epiteliales así como una disminución de la población NK en la mucosa duodenal de pacientes celíacos. Dentro de los LIE destaca el aumento que sufre la población de células  $T\gamma\delta$  que, además, es la única población que permanece aumentada tras la exclusión del gluten de la dieta. El diagnóstico inicial de la EC se realiza generalmente mediante la detección en plasma sanguíneo de anticuerpos anti-TG2. La confirmación del diagnóstico se basa en la demostración causal entre la ingesta de gluten y la enteropatía característica de la enfermedad, considerando el estudio histológico de la biopsia como la prueba de referencia o *gold standard*. Sin embargo, las alteraciones observadas en la mucosa no son patognomónicas de la EC, y pueden ser observadas también en otras patologías intestinales. Esta falta de especificidad de la biopsia hace que el estudio de las variaciones cuantitativas descritas para los LIE y analizadas por citometría de flujo sea una herramienta eficaz para llegar al diagnóstico de confirmación de la enfermedad. Por ello nos planteamos validar esta técnica en nuestra población de estudio para incorporarla al diagnóstico. Según los resultados presentados en esta tesis,

la determinación combinada de las variaciones en las tres poblaciones de LIE estudiadas (aumento de LIE totales, disminución de células NK-*like* y aumento de las células T $\gamma\delta$ ) es lo que aporta la mayor especificidad y sensibilidad a esta prueba diagnóstica de la EC. Los porcentajes que obtuvimos para cada una de las subpoblaciones de LIE en cada uno de los grupos de pacientes estudiados fueron muy similares a los obtenidos por otros investigadores, lo que nos permitió validar este método como una herramienta útil en el diagnóstico de la EC y de aplicación beneficiosa en la práctica clínica.

La implicación de los LIE en la EC parece clara y está bien documentada. Sin embargo no ocurre lo mismo en la EII. En la respuesta inmunitaria que se produce en la EII existe un ambiente enriquecido en citocinas pro-inflamatorias, fundamentalmente la IL-23, que están implicadas en el desarrollo, activación y supervivencia de diferentes poblaciones de LIE. Liu et al. demostraron recientemente, que los LIE aislados de pacientes con EII tenían una mayor capacidad citolítica frente a las CEI. Todo ello parece sugerir la implicación directa de los LIE en la EII. Aunque no se conoce muy bien el papel que juegan los LIE en los mecanismos inmunopatogénicos de la EII, el estudio de las alteraciones que sufren estas poblaciones puede llevarnos a un mejor conocimiento de la enfermedad, así como al desarrollo de nuevos métodos diagnósticos y de caracterización de pacientes. Por todo ello, nos hemos planteado explorar si en la enfermedad de Crohn (ECr) y la colitis ulcerosa (CU) se producen modificaciones en la distribución normal de las diferentes poblaciones de LIE en la mucosa afectada por la enfermedad y si la determinación de estas modificaciones por citometría de flujo es útil como método de apoyo al diagnóstico diferencial entre ambas entidades y con otras patologías inflamatorias gastrointestinales. Nuestros resultados mostraron que la mucosa afectada por ECr, independientemente de si se trataba de una muestra de colon o de íleon, presentaba un gran aumento de células NK-*like* al compararlo con el resto de grupos, lo que permitiría diferenciar entre la ECr y el resto de patologías intestinales.

Mientras que la EC sólo afecta a la mucosa duodenal, el intestino grueso es el principal tejido afectado por la ECr y la CU. Las poblaciones de LIE se distribuyen de forma diferente en el epitelio del intestino delgado y del intestino grueso. Este patrón de distribución está probablemente influido por las funciones digestivas tan dispares y las condiciones fisiológicas existentes en cada tramo. Sin embargo, el colon siempre ha sido considerado como un único tramo desde el punto de vista anatómico y funcional. Estudios recientes muestran que el colon proximal y distal presentan diferente origen embriológico, vascularización y drenaje linfático, además de una actividad enzimática diferente. Ya dentro del compartimento epitelial, se ha observado que las células epiteliales del colon proximal y del colon distal difieren en su perfil de expresión génica. Por todo ello nos hemos planteado establecer, por citometría de flujo, los valores normales para cada una de las subpoblaciones de LIE en la mucosa intestinal y estudiar si la distribución de estas poblaciones varía a lo largo del tubo digestivo. Según nuestros resultados, dentro del intestino delgado, el compartimento intraepitelial del íleon presenta un mayor porcentaje de linfocitos T, con una mayor proporción de células T CD8<sup>+</sup>, comparado con el duodeno. Respecto al intestino grueso, los datos obtenidos mostraron que el colon derecho presenta un mayor porcentaje de LIE totales,

siendo fundamentalmente linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Sin embargo, el colon izquierdo presenta un aumento de los linfocitos T $\gamma\delta$  y de células NK-like respecto al colon derecho, así como de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Debido a la proximidad entre el colon derecho e izquierdo, decidimos estudiar si estas variaciones en las subpoblaciones de LIE eran debidas a diferencias en la expresión de los ligandos propios de las moléculas que intervienen en los mecanismos de migración de los LIE y las CD a la mucosa intestinal, encontrando diferencias entre ambos tramos del colon.

Una de las poblaciones que se encuentra en el compartimento intraepitelial intestinal son las células T *natural killer* invariantes (iNKT), con características tanto innatas como adaptativas, estando implicadas en los fenómenos de tolerancia oral a pesar de encontrarse en una proporción mucho menor que el resto de poblaciones de LIE. Sin embargo, las alteraciones cuantitativas y/o funcionales de esta subpoblación pueden favorecer la aparición de diversas patologías como la EII y la EC. Los diferentes estudios de cuantificación de células iNKT circulantes e intestinales en pacientes celíacos han dado resultados contradictorios. Hasta el momento no existe un consenso ni acerca del número de las iNKT en el duodeno de los pacientes celíacos, ni acerca de su participación en la etiopatogenia de la enfermedad, por lo que en esta tesis nos hemos planteado evaluar si la población de células iNKT sufre también alteraciones en el compartimento intraepitelial del duodeno afectado por EC y si esta alteración puede favorecer la respuesta patogénica que se produce en la mucosa duodenal. Los resultados obtenidos muestran un aumento de la población de iNKT, con un fenotipo predominante CD4<sup>+</sup>, en el compartimento intraepitelial del duodeno de los pacientes celíacos. Asimismo, se encontró una correlación entre la expresión de ARNm de V $\alpha$ 24 y la gravedad de la lesión de la mucosa, y la expresión de ARNm de IFN $\gamma$ , tanto en condiciones basales como tras la estimulación de biopsias duodenales con gluten. Por último, el balance entre la expresión de ARNm de V $\alpha$ 24 y de FoxP3 podría definir un perfil molecular característico de la EC.

Como se ha comentado anteriormente, otra de las poblaciones de células que participan en los fenómenos de tolerancia oral y en la respuesta innata son las células dendríticas. Las CD son capaces de responder de forma rápida y eficiente al microambiente en el que se encuentran, lo que les confiere la capacidad de controlar el sistema inmunitario y el balance entre los mecanismos de inflamación y tolerancia. Sin embargo, estas células también están implicadas en la inmunopatogenia de la EC, y son clave en la respuesta adaptativa frente al gluten. Las CD expresan receptores de lectinas de tipo C o CLRs, especialmente DC-SIGN. La mayoría de los ligandos endógenos que se han descrito para DC-SIGN presentan un alto contenido en carbohidratos que al ser reconocidos por el receptor desencadenan determinados mecanismos implicados en los fenómenos de homeostasis intestinal. DC-SIGN también está implicado en fenómenos de diferenciación, reprogramación y expresión de determinados genes codificantes de citocinas que condicionan el fenotipo y la actividad final de las CD. Dado que las CD son uno de los principales componentes de la respuesta inmune en la EC, la señalización a través de DC-SIGN puede tener un efecto directo en la modulación de la respuesta

frente al gluten, por lo que decidimos estudiar la expresión de este receptor en la mucosa duodenal. Los resultados obtenidos en esta tesis mostraron que DC-SIGN estaba aumentado en las células de la LP de los pacientes celíacos no tratados. En estos pacientes se observó que todas las células DC-SIGN<sup>+</sup> eran HLA-DR<sup>+</sup>, es decir células presentadoras de antígeno. Por lo tanto, la modulación de la respuesta inmunitaria en los pacientes celíacos utilizando ligandos específicos de DC-SIGN como vehículo de péptidos de la gliadina parece una buena estrategia en el tratamiento inmunoterápico de la EC.

Uno de los principales péptidos que se han identificado con capacidad para desencadenar la respuesta adaptativa es el péptido inmunodominante p57-89 de la  $\alpha$ -gliadina (33mer). Por ello, parte de nuestro trabajo se ha centrado en la glicosilación del 33mer para tratar de modular la respuesta pro-inflamatoria producida por el péptido nativo, a través de la señalización mediada por CD DC-SIGN<sup>+</sup>. Como resumen de nuestros resultados podemos decir, que la glicosilación del péptido 33mer en disposición dendrímica con ligandos endógenos específicos de DC-SIGN, como son los carbohidratos de tipo Lewis, podría llevar a la modulación de la respuesta pro-inflamatoria generada por el gluten en el duodeno de los pacientes celíacos. Sin embargo hace falta un estudio más exhaustivo para confirmar estos datos.

La respuesta adaptativa, mediada por CD, frente al gluten en los pacientes celíacos también engloba una respuesta humoral mediada por linfocitos B. Las células T específicas de gluten, en el contexto de un perfil Th2 de citocinas inducen la proliferación de las células B que se diferencian a células plasmáticas y producen anticuerpos frente a los péptidos desaminados derivados del gluten y frente a la enzima TG2. En este contexto, nuestro grupo de investigación identificó en el plasma de pacientes celíacos, anticuerpos IgA específicos frente a la forma desaminada de un nuevo péptido de 8 aminoácidos (8mer: FPLQPQQP, 8mer desaminado: FPLQPEQP). Este péptido había sido identificado por primera vez en nuestro laboratorio, como un producto específico de la degradación diferencial por proteasas del intestino celíaco. Por todo ello nos propusimos investigar el posible efecto inmunogénico del péptido 8mer en un modelo *in vitro* de CD de sangre periférica y linfoproliferativo autólogo. Los resultados obtenidos en esta tesis muestran que el péptido desaminado 8mer es capaz de producir una respuesta inmunitaria pro-inflamatoria, a través de la activación/maduración de células dendríticas con un perfil complejo de producción de citocinas en el que destacan IL-4, IL-6 y TGF $\beta$ , y la proliferación de linfocitos T productores de IFN $\gamma$ , independientemente de si la presentación antigénica es mediada por células dendríticas HLA-DQ2<sup>+</sup> o DQ2<sup>-</sup>.

# **1.- INTRODUCCIÓN**

---

## 1.- INTRODUCCIÓN

---

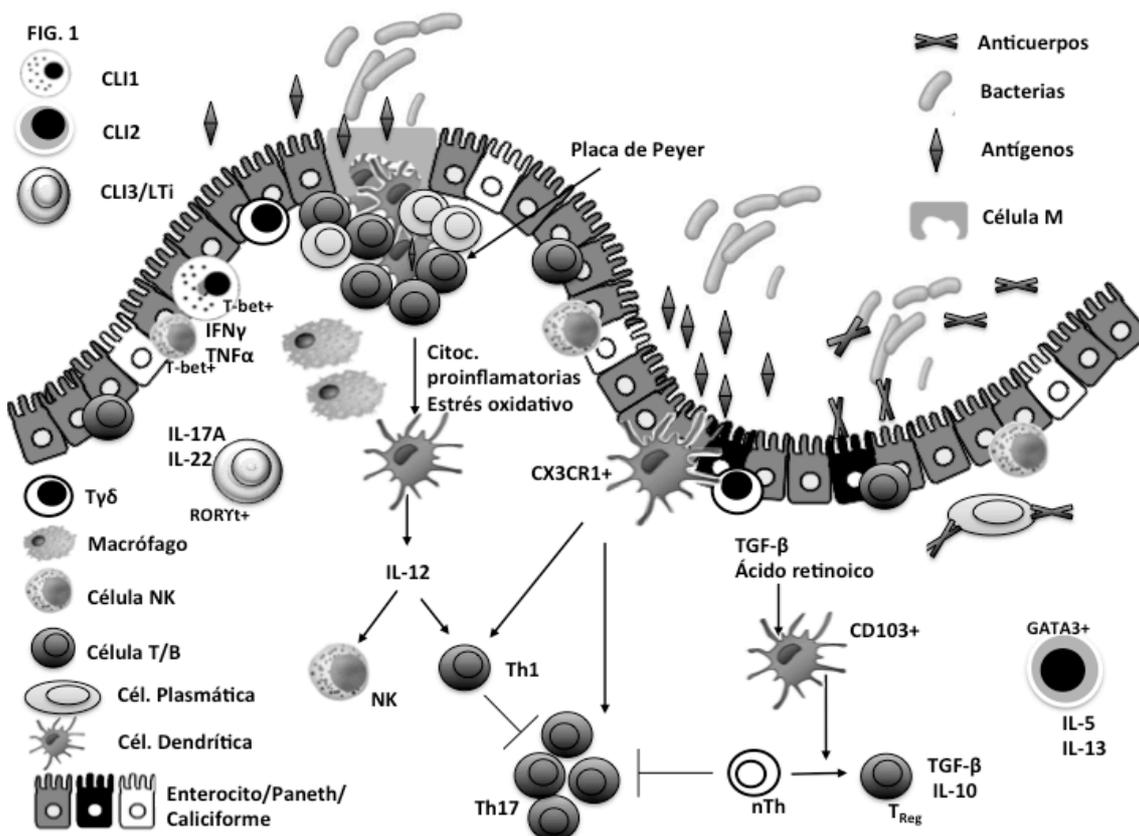
El tracto gastrointestinal contiene la mayor concentración de células inmunitarias del organismo humano, y recibe continuamente una gran carga antigénica que no llega sólo a través de la alimentación sino también por la flora saprófita del intestino (Hooper et al., 2012).

El intestino está formado por 2 partes anatómicamente diferenciadas, una superior (intestino delgado) que incluye al duodeno, yeyuno e íleon; y otra inferior (intestino grueso) con el colon, ciego y recto. Ambas partes tienen funciones diferentes. El intestino delgado desempeña funciones: a) de secreción de enzimas para la digestión; b) absorción de nutrientes a través de las vellosidades; c) motoras gracias a la muscularis mucosae; y d) defensivas frente a microorganismos o diversos antígenos. El intestino grueso: a) recibe y almacena sustancias provenientes del intestino delgado; b) absorbe sales y agua; y c) es el lugar de acción para la flora intestinal, que tiene una función protectora (Macdonald and Monteleone, 2005). Para que se puedan realizar de una manera óptima todas estas funciones debe existir un estado de homeostasis que permita a la red de tejidos tanto linfoides como no linfoides y moléculas efectoras, discriminar entre organismos invasores, y antígenos inocuos de la dieta o bacterias comensales, y desarrollar tolerancia oral frente a estos últimos. Los mecanismos principales de tolerancia son: anergia o deleción de linfocitos autoreactivos, y supresión activa (Wittig and Zeitz, 2003). Una respuesta descontrolada de las células T de la mucosa puede desencadenar trastornos inmunológicos como alergia, hipersensibilidad o autoinmunidad (Neurath et al., 2002). La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) o la Enfermedad Celíaca (EC), caracterizadas por reacciones de hipersensibilidad a la flora bacteriana o a antígenos provenientes de la dieta respectivamente, son dos ejemplos de estas situaciones.

Las respuestas inmunitarias innata y adaptativa constituyen un sistema integral de defensa del huésped. La principal diferencia entre ambas reside en la especificidad de la respuesta inmunitaria adaptativa, que mejora con los sucesivos contactos con el mismo antígeno, aunque requiere más tiempo para desarrollarse. Sin embargo, el intestino soporta de forma continua una gran carga antigénica que requiere de una respuesta rápida aunque inespecífica, para mantener la homeostasis intestinal y proteger al organismo de la entrada de patógenos. Esta respuesta depende de la inmunidad innata (Maynard et al., 2012).

## 1.- INTRODUCCIÓN

La mucosa intestinal incluye una primera barrera defensiva de células epiteliales intestinales (CEI), o enterocitos, que mantienen la integridad del epitelio, y a su vez, están especializadas en la absorción de fluidos y nutrientes. Además, la mucosa está equipada con un sistema inmunitario intrínseco altamente especializado (figura 1), que garantiza este transporte óptimo de nutrientes y previene la traslocación de las bacterias comensales o patógenas (Rescigno, 2011).



**Figura 1. Sistema inmunitario asociado a la mucosa intestinal.** El epitelio intestinal está compuesto por los enterocitos, encargados de la absorción de moléculas de los alimentos y su transporte al interior del organismo, las células caliciformes, encargadas de secretar la capa mucosa protectora, y las células de Paneth que secretan péptidos antimicrobianos. Entre las células epiteliales se encuentra una población heterogénea de linfocitos intraepiteliales (T $\alpha\beta$ , Ty $\delta$ , NK, NKT) que actúan como primera barrera defensiva. La captación antigénica es llevada a cabo por las células M de las placas de Peyer (cúmulo de células B y T, macrófagos y células dendríticas), o directamente por los enterocitos a través de tolerosomas. En estos casos, se secretan TGF $\beta$  y ácido retinoico a la lamina propia (LP) mucosa que induce la diferenciación de las Células Dendríticas (CD) hacia un perfil tolerogénico (CD103<sup>+</sup>), capaces de inducir la diferenciación de células T reguladoras. Sin embargo, en algunas circunstancias las CD de la LP tienen acceso directo a los antígenos mediante la emisión de prolongaciones entre los enterocitos (CD CX3CR1<sup>+</sup>) o cuando se rompe la integridad epitelial, lo que podría dar lugar a una respuesta proinflamatoria. Las células linfoides innatas se distribuyen tanto en el epitelio como en la LP participando en la respuesta temprana contra agentes patógenos, la contención anatómica de la flora comensal y el mantenimiento de la integridad epitelial.

### 1.1. Tejido linfoide asociado al intestino.

El tejido linfoide asociado al intestino (TLAI) se puede dividir estructural y funcionalmente en tejido linfoide de inducción y tejido linfoide efector (Mowat, 2003). El tejido de inducción está formado por estructuras de tejido linfoide que se encuentran en la pared del intestino, como las Placas de Peyer (PP) en el intestino delgado, y los folículos linfoides mesentéricos (FLM) aislados, que presentan analogías estructurales con las PP, y que se encuentran tanto en el intestino grueso como en el intestino delgado. Ambos se responsabilizan de la captación, procesamiento, y presentación de antígenos. El tejido efector está formado por estructuras anatómicas, como la lamina propia (LP) mucosa y el epitelio intestinal, donde asientan las células T y B maduras que migran desde las PP y FLM (Mowat, 2003).

#### 1.1.A. Tejidos de inducción: Placas de Peyer y folículos linfoides mesentéricos.

Las PP contienen folículos de células B y áreas de intervención formadas por células T. Estas áreas linfoides se encuentran separadas del lumen intestinal por una columna simple de células epiteliales que reciben el nombre de *epitelio especializado asociado al folículo* (EAF). Inmediatamente debajo se encuentra un área difusa conocida como *dominio subepitelial* (DSE). El EAF se diferencia del epitelio que cubre a la mucosa vellositaria en que presenta menos enzimas digestivas y un reborde en cepillo menos pronunciado. Por debajo se encuentra un infiltrado de células B, células T, macrófagos y células dendríticas (CD). La característica más importante del EAF es la presencia de células M (Debard et al., 2001), que son enterocitos especializados sin microvellosidades en su superficie con capacidad de unirse a patógenos y antígenos transportándolos desde el lumen del intestino al interior de las PP, donde son captados por las células presentadoras de antígeno (CPA). Estas CPA migran después a la región de las células T del folículo, donde presentan el antígeno a las células T *vírgenes*. Aunque durante muchos años se ha pensado que la única vía de presentación antigénica en el intestino era mediante las células M, se ha descrito después que estas células no expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, Major Histocompatibility Complex) de clase II en superficie (al contrario de las células epiteliales). Las células M parecen pasar directamente el antígeno intacto a las CPA,

## 1.- INTRODUCCIÓN

especialmente a las CD, que son las células mayoritarias en el dominio subepitelial de las PP (Acheson and Luccioli, 2004).

Otra vía de captación y presentación de antígeno estaría mediada directamente por las CD, que son capaces de emitir sus dendritas a través de las *uniones estrechas* entre las células epiteliales hacia el lumen intestinal para detectar y reconocer tanto bacterias como otras proteínas, induciendo una respuesta más rápida y específica frente a un posible patógeno (Rimoldi et al., 2005).

En el folículo linfoide es donde se desencadena el proceso de cambio de isotipo a inmunoglobulina (Ig)A en las células B, localizadas en el centro germinal de las PP, que salen después por las vías linfáticas eferentes para migrar a la LP mucosa donde se produce la diferenciación terminal a células plasmáticas (Mora et al., 2006).

Los nódulos linfoides mesentéricos o FLM son los nódulos linfoides más grandes del organismo. Su desarrollo difiere del desarrollo de las PP y de los nódulos linfoides periféricos y no se ve afectado por los factores implicados en la ontogenia de estos otros órganos, incluyendo el factor de necrosis tumoral (TNF, Tumor Necrosis Factor), y el receptor de linfotoxinas- $\beta$  (LT $\beta$ R, *Lymphotoxin- $\beta$  receptor*). Desde el punto de vista morfológico y estructural, son muy parecidos a las PP, pero su función aún no está bien definida. La acumulación de linfocitos en el FLM requiere de la expresión tanto de L-selectina como de la integrina  $\alpha 4\beta 7$  (Wagner et al., 1998).

### **1.1B. Tejidos efectores: lamina propia mucosa y epitelio intestinal.**

La mucosa intestinal está formada por dos capas bien diferenciadas: el epitelio y la lamina propia que, a su vez, contienen poblaciones celulares diferentes.

#### **1.1B.1 Lamina propia mucosa.**

Es la zona de la mucosa que se encuentra debajo del epitelio vellositario, entre las criptas. Es la estructura que da forma y sustento a toda la mucosa intestinal, y está repleta de células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas (Ig), y un gran número de células T, macrófagos, mastocitos y eosinófilos. Es un lugar de diferenciación celular (Acheson and Luccioli, 2004). Los leucocitos de la LP también expresan en su membrana gran cantidad de marcadores de activación como CD25 y el receptor de antígeno leucocitario humano (HLA-DR, *human leukocyte antigen receptor*) debido a

su exposición permanente a antígenos. Comparado con los linfocitos de la sangre periférica, su capacidad de proliferación es menor cuando son estimulados con mitógenos o antígenos específicos, aunque la producción de citocinas no disminuye (Wittig and Zeitz, 2003). Los linfocitos T de la LP son maduros y algunos de ellos expresan un fenotipo de memoria, CD45 RO, y niveles altos de la integrina  $\alpha 4\beta 7$  (importante para una migración selectiva al tejido intestinal), así como el receptor de quimiocinas CCR (*C-C chemokine receptor*)-9 (Hart et al., 2010). Entre las células T efectoras, destaca la presencia mayoritaria de células T CD4<sup>+</sup> (60-70%), de las cuales un 95% expresan el receptor de células T (TCR, *T-cell receptor*) con fenotipo  $\alpha\beta$ . También se encuentran algunos linfocitos T CD8<sup>+</sup> (30-40%), la mayoría de los cuales expresan homodímeros de su cadena  $\alpha$ : CD8<sup>+</sup>  $\alpha\alpha$ , y cuya actividad citolítica es importante en el control de situaciones de infección (Cheroutre and Madakamutil, 2005). Los macrófagos y las células dendríticas funcionan como CPA para los linfocitos T y, por tanto, pueden polarizar la diferenciación de estas hacia un fenotipo cooperador o Thelper (Th) Th1, Th2 o Th17 dependiendo de las interacciones celulares con el antígeno, citocinas presentes en el medio, y de la propia maduración del linfocito T (Mowat and Bain, 2011; Persson et al., 2013).

**Las células dendríticas (CD)** son las principales CPA de la mucosa intestinal, capaces de iniciar una respuesta inmunitaria específica frente a un determinado antígeno (Banchereau and Steinman, 1998; Ueno et al., 2007). Sin embargo, además de su capacidad de controlar una respuesta proinflamatoria, las CD son potentes inductores de la tolerancia oral frente a antígenos procedentes de la dieta y de la flora intestinal (Rescigno, 2010a; Steinman et al., 2003; Worbs et al., 2006). Las CD de la mucosa intestinal se localizan en la LP, en los FLM y en las PP (Pabst and Bernhardt, 2010; Rescigno, 2010a, b).

Las CPA de la mucosa intestinal pueden clasificarse en dos grandes subgrupos dependiendo de la expresión de CX3CR1 (receptor de fractalkina) o CD103 ( $\alpha E$  integrina). Según esta clasificación, en el intestino se encuentran al menos 3 tipos de CPA: las CD CX3CR1<sup>-</sup>CD68<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup> o células dendríticas CD103<sup>+</sup>, las CD CX3CR1<sup>+</sup>CD68<sup>-</sup>CD103<sup>-</sup> o células dendríticas CX3CR1<sup>+</sup>, y, por último, los macrófagos clásicos CX3CR1<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> (Bogunovic et al., 2009; Denning et al., 2007b; Niess and Adler, 2010; Rescigno, 2009; Schulz et al., 2009).

## 1.- INTRODUCCIÓN

En condiciones basales de ausencia de inflamación, las células inmunitarias de la mucosa intestinal y los enterocitos secretarían el factor transformante de crecimiento beta (*Transforming growth factor beta* TGF $\beta$ ), ácido retinoico y la linfopoyetina estromal tímica (Thymic stromal lymphopoietin, TSLP), que inducirían la diferenciación de las CD inmaduras (CDi) a células dendríticas CD103<sup>+</sup>, con un fenotipo regulador frente a los antígenos no patogénicos (Coombes et al., 2007; Iliev et al., 2009; Matteoli et al., 2010; Sun et al., 2007). Este fenotipo regulador se caracteriza por la expresión disminuida tanto de los receptores de reconocimiento de patrones (RRP) como de los *Toll-like receptors* (TLR) (Bernardo, 2013; Hart et al., 2005), una menor expresión de moléculas co-estimuladoras en su superficie y una mayor producción de citocinas reguladoras, como la interleucina (IL)-10 (Bernardo, 2013; Hart et al., 2005). En estas condiciones, las CD del intestino humano favorecen la diferenciación de células T reguladoras (Treg) y células B específicas de antígeno (Xiao et al., 2008) y secretora de IgA, respectivamente (Bernardo, 2013; Mora et al., 2006) (figura 1). Por último, estudios recientes sugieren que únicamente las CD CD103<sup>+</sup> son capaces de inducir la expresión de marcadores de migración selectiva al intestino ( $\alpha 4\beta 7$  y/o CCR9) tanto en las células B como en las células T vírgenes (Bekiaris et al., 2014; Denning et al., 2007b; Jaensson et al., 2008; Mora et al., 2006; Strober, 2008).

Por el contrario, las CD CX3CR1<sup>+</sup> presentan un fenotipo proinflamatorio y son las encargadas de poner en marcha respuestas inmunitarias frente a patógenos invasores (Bogunovic et al., 2009; Rescigno, 2009). Cuando existe una señal de peligro, las CDi inician su maduración, produciéndose un aumento de la expresión de moléculas HLA y de moléculas co-estimuladoras como CD80 (B7.1)/CD86 (B7.2) (ligandos de CD28/CTLA4 en los linfocitos T) o CD40 (ligando de CD40L en los linfocitos T) (Banchereau and Steinman, 1998; Bernardo, 2013; Palucka and Banchereau, 2002; Shortman and Liu, 2002). Estas CD presentan un aumento en la producción de citocinas proinflamatorias, en detrimento de citocinas reguladoras (Banchereau and Steinman, 1998; Palucka and Banchereau, 2002; Shortman and Liu, 2002). Las CD CX3CR1<sup>+</sup> pueden emitir prolongaciones entre las células epiteliales hasta la luz intestinal para captar directamente antígenos (Rescigno, 2010b) (figura 1). Estas CD CX3CR1<sup>+</sup> tienen la capacidad de inducir una respuesta Th17 *in vitro* (Denning et al., 2007b), son capaces de destruir ciertas bacterias (Bogunovic et al., 2009; Farache et al., 2013; Rescigno et al., 2001) y, sin embargo, no tienen capacidad de migrar a los nódulos linfáticos mesentéricos (Schulz et al., 2009). Por todo ello las CD CX3CR1<sup>+</sup> se encuentran más

cerca de la definición de macrófagos que de la de CD clásicas (Mann et al., 2013; Rescigno, 2011).

Sin embargo, las CD intestinales presentan una plasticidad importante. Ante una señal de peligro, las CD CD103<sup>+</sup> no siempre son tolerogénicas y pueden llegar a desencadenar una respuesta proinflamatoria, debido a que pierden la capacidad de generar células Treg e inducen la diferenciación de células T productoras de interferon (IFN)- $\gamma$  (Laffont et al., 2010). Del mismo modo, las CD CX3CR1<sup>+</sup> no siempre presentan un fenotipo proinflamatorio y pueden llegar a secretar grandes cantidades de IL-10, favoreciendo los mecanismos de tolerancia oral (Hadis et al., 2011). Esta plasticidad de las CD pone de manifiesto la gran importancia que tiene el microambiente donde se produce la maduración de las mismas (Bekiaris et al., 2014).

### 1.1B.2 El epitelio intestinal.

Es una barrera que separa el organismo del contenido de la luz intestinal, compuesta por una capa de células especializadas con un reborde en cepillo en la superficie de contacto con el lumen. Estas CEI o enterocitos son responsables de la absorción de los nutrientes y de vertir IgA al interior del tubo digestivo, y pueden producir también péptidos antimicrobianos y citocinas proinflamatorias en respuesta a los antígenos bacterianos, por lo que no sólo tienen una función pasiva como barrera biológica sino que pueden intervenir activamente en la respuesta inmunitaria (Artis, 2008). Recientemente, se ha surgido que la célula epitelial puede actuar como célula presentadora tras captar antígeno en los microvilli de la superficie apical y presentarlo a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> en la superficie basal (Diebold et al., 1995). Esta presentación de antígeno se realiza a través de moléculas MHC de clase II y en ausencia de las moléculas co-estimuladoras (Kobayashi et al., 1999), por lo que los enterocitos son buenos candidatos como CPA tolerogénicas. Otra particularidad de estas células, todavía no confirmada, es la capacidad de incorporar el antígeno en exosomas con moléculas MHC de clase II. Los exosomas son vesículas lipídicas de unos 40nm de diámetro, denominados *tolerosomas*, que son capaces de inducir tolerancia oral, y participan también en la comunicación directa de información inmunológica entre células (Yang et al., 2007).

El epitelio incluye también otras células especializadas como son las células caliciformes, encargadas de secretar la capa de *mucus* protectora que recubre al epitelio,

## 1.- INTRODUCCIÓN

---

y las células de Paneth, que secretan grandes cantidades de péptidos antimicrobianos y se encuentran en las criptas del intestino delgado, pero no en el colon (Mowat, 2003).

Los **linfocitos intraepiteliales (LIE)** son una serie de subpoblaciones heterogéneas de linfocitos que se encuentran entre las CEI. Estas subpoblaciones se distribuyen de forma variable a lo largo del intestino delgado y del intestino grueso. Este patrón de distribución alternativo se debe probablemente a las diferencias fisiológicas y funcionales presentes en ambos tramos intestinales (Cheroutre et al., 2011). La mayoría de los LIE contiene abundantes gránulos citoplasmáticos con actividad citotóxica, y pueden secretar citocinas efectoras, tales como IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4 o IL-17 (Ebert and Roberts, 1993; Shires et al., 2001; Tang et al., 2009). Además, estas poblaciones pueden expresar receptores propios de las células NK, como NKG2D (Shires et al., 2001; Tang et al., 2009; Yamagata et al., 2004). Aunque su principal función es la protección y defensa de la mucosa intestinal, en algunas ocasiones pueden contribuir al desencadenamiento de respuestas inmunitarias patológicas, como ocurre en la EC (Abadie et al., 2012; Meresse et al., 2006) y en la EII (Kunisawa et al., 2007; Liu et al., 2011; Schaefer et al., 2010).

Los LIE expresan en su superficie CCR9, cuyo ligando CCL25 (ligando de quimiocinas-25, *chemokine C-C motif ligand-25*) es producido por las CEI, jugando un papel clave en la migración de los LIE al intestino (Gangadharan et al., 2006; Staton et al., 2006). Además, los LIE expresan la integrina  $\alpha E\beta 7$  (CD103), que interacciona con la molécula e-cadherina que se expresa en los enterocitos, y permite las interacciones entre ambas poblaciones celulares (Cepek et al., 1994; Grueter et al., 2005; Hart et al., 2010; Kilshaw and Murant, 1990; Staton et al., 2006). La mayoría de los LIE expresa el homodímero CD8 $\alpha\alpha$  en su superficie, lo cual es sello inconfundible de su estado activado (Denning et al., 2007a; Leishman et al., 2002; Madakamutil et al., 2004).

Los LIE se clasifican, dependiendo de su mecanismo de activación y el tipo de antígenos que reconocen, en dos grandes grupos: LIE naturales y LIE inducidos (Cheroutre et al., 2011).

Los LIE naturales se subdividen en: 1) Linfocitos T TCR $\gamma\delta$ , cuyas funciones principales son la reparación y el mantenimiento de la barrera epitelial, la defensa frente a patógenos intestinales y contribuir a los mecanismos de tolerancia oral (Boismenu and Havran, 1994; Fujihashi et al., 1999; Komano et al., 1995). 2) Linfocitos T TCR $\alpha\beta$  CD8 $\alpha\alpha^+$ , que intervienen en la protección de la barrera mucosa en el momento de la

colonización bacteriana y como primera barrera defensiva hasta que se desencadena una respuesta inmunitaria específica frente al patógeno que la ha generado (Denning et al., 2007a; Shires et al., 2001). Los LIE naturales se generan en el timo por un proceso de maduración alternativo en el que se seleccionan linfocitos T doblemente negativos ( $CD4^-CD8^-$ ) con un marcador CD3 atípico ( $CD3\zeta$ - $Fc\epsilon RI\gamma$  o  $Fc\epsilon RI\gamma$ - $Fc\epsilon RI\gamma$ ), que se dirigen posteriormente al intestino donde sufren un proceso de maduración final (Cheroutre et al., 2011).

Los LIE inducidos proceden de la selección positiva de células precursoras de linfocitos T  $TCR\alpha\beta$   $CD8\alpha\beta^+$  o linfocitos T  $TCR\alpha\beta$   $CD4^+$  que se produce normalmente en el timo. Una vez en la sangre, estas células precursoras se convierten en linfocitos T  $TCR\alpha\beta$   $CD4^+$  o  $CD8^+$  vírgenes. Estos linfocitos vírgenes se pueden diferenciar a células T  $TCR\alpha\beta$   $CD4^+$  o  $CD8^+$  maduras en respuesta a ciertos antígenos, migrando al intestino para formar parte de los LIE inducidos presentes en el epitelio intestinal, y que tienen por funciones el mantenimiento de la barrera epitelial, impedir la traslocación de bacterias patógenas y controlar la respuesta inmunitaria frente a antígenos no patogénicos (Carpenter and Bosselut, 2010; Cheroutre et al., 2011; Collins et al., 2009; Singer et al., 2008).

La proporción de LIE en la mucosa intestinal varía a lo largo del intestino, siendo máxima en el intestino delgado proximal, con un porcentaje aproximado del 25% en adultos sanos (Camarero et al., 2007). Este porcentaje disminuye progresivamente según vamos avanzando hacia la zona distal del intestino grueso, con un porcentaje aproximado del 5% de LIE en el recto (Leon et al., 2003). La mayoría de los LIE (>70%) son células T  $CD3^+$  y una minoría (10-20%) son células  $CD3^-$ . De los LIE  $CD3^+$ , un 80% expresa un  $TCR\alpha\beta$ , siendo en la gran mayoría linfocitos T  $CD8^+$  (>85%), mientras que sólo un 10% de los LIE  $TCR\alpha\beta$  expresarían el marcador CD4. El resto de LIE  $CD3^+$  expresa el  $TCR\gamma\delta 1$ , con una proporción aproximada del 10% en el yeyuno que puede llegar hasta un 30% en el íleon y en el colon. Los linfocitos  $T\gamma\delta$  presentan una expresión variable de CD8 (40-80%) siendo la mayor parte  $CD8\alpha\alpha$  (Bhagat et al., 2008).

Además de estas poblaciones, en el epitelio se ha descrito un importante grupo de LIE con fenotipo  $CD3^-$  sugerente de pertenencia a un linaje *natural killer* (NK, células citolíticas naturales) (Camarero et al., 2000; Eiras et al., 2000; Spencer et al., 1989) por lo que se denominan células *NK-like*. Estas células presentaron un fenotipo  $CD3-CD7+CD103+CD122+$ , además de un perfil marcado perteneciente a la estirpe de

## 1.- INTRODUCCIÓN

---

células NK (CD161+CD94+CD16-CD56+). Dentro de este grupo encontramos células T precursoras, y células NK y, ocasionalmente, linfocitos aberrantes que se caracterizan por la internalización de la molécula CD3 al citoplasma y su ausencia en la membrana celular (Camarero et al., 2000; Cellier et al., 1998; Leon et al., 2003). Estas células aberrantes se presentan en la EC refractaria pero pueden aparecer en cualquier tipo de inflamación intestinal, y son un paso previo en la forma de lesiones de tipo neoplásicas como es el linfoma intestinal (Cellier et al., 1998). Los LIE CD3<sup>-</sup> en el feto son fundamentalmente células precursoras de linfocitos T, aunque también se encuentran células NK en esta etapa. En los niños, la población *NK-like* es una mezcla de células precursoras y células NK, siendo esta última población cada vez más predominante según avanza la edad. En la vejez y en situaciones patológicas como la EC refractaria y el linfoma asociado a la mucosa intestinal, se produce un aumento de linfocitos T aberrantes que internalizan el receptor CD3 (Camarero et al., 2000).

Por último, dentro de los LIE encontramos también una población con características duales como son las células T natural killer invariantes o iNKT, que se consideran células linfoides innatas (CLI) y que tienen especial importancia dentro de la tolerancia oral (Godfrey et al., 2004; Wingender and Kronenberg, 2008).

### 1.2. Poblaciones celulares linfoides en la mucosa intestinal.

Los LIE y los linfocitos de la LP juegan un papel primordial en el sistema inmunitario asociado a la mucosa intestinal. Estas poblaciones linfoides intervienen tanto en los mecanismos de tolerancia frente a la flora saprófita y los antígenos alimentarios, como en el desencadenamiento de la respuesta inmunitaria frente a posibles patógenos. La alteración tanto cuantitativa como funcional de estas poblaciones puede contribuir al desarrollo de diversas patologías intestinales, como la EC y la EII.

#### 1.2A.1. Linfocitos TCRαβ.

Los LIE TCRαβ son predominantemente linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y dobles negativos. Los linfocitos CD4<sup>+</sup> se denominan linfocitos T helper (Th) o cooperadores. Se estimulan tras la presentación de antígeno en el contexto de moléculas MHC tipo II y producen una serie de citocinas que median en el proceso inmunitario. La polarización de las células T CD4<sup>+</sup> hacia los subtipos Th1, Th2, Th3, Treg y Th17 está regulada por

la interacción de las células dendríticas con los linfocitos *vírgenes*, así como por el ambiente en el que se desarrolla esta interacción. Estos subtipos celulares presentan una capacidad de producción de citocinas característica en cada caso (Mowat, 2003): Th1 secretan citocinas pro-inflamatorias como la IL-12, IFN $\gamma$  o el TNF $\alpha$ ; Th2 presenta un perfil inmunomodulador y secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, además de promover la expresión de IgA; Th3 o Th reguladoras producen factor transformante de crecimiento (TGF, *transforming growth factor*)- $\beta$  TGF $\beta$  e IL-10, y Th17 secretan IL-17, IL-6 y TNF $\alpha$  (Kikly et al., 2006).

Los linfocitos CD4<sup>+</sup> se encuentran predominantemente en la LP, por debajo del epitelio y alrededor de las criptas, y en menor proporción en el epitelio donde se presentan en mayor proporción los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Los linfocitos TCD8<sup>+</sup> migran preferentemente al epitelio aunque alrededor del 40% de las células T de la LP son CD8<sup>+</sup>, y las que se encuentran en esta localización desarrollan una función citotóxica, por lo que se denominan linfocitos T citotóxicos (Tc). Son estimulados por células que presenten moléculas MHC de clase I y desarrollan su acción a través de la secreción de perforinas que producen la lisis de la célula diana o mediante la interacción con esta célula y puesta en marcha de los mecanismos de apoptosis.

### 1.2A.2. Linfocitos T $\gamma\delta$ .

Las células T $\gamma\delta$  son células T (CD3<sup>+</sup>) con un TCR de cadenas  $\gamma\delta$ . Reconocen moléculas MHC-I no clásicas y otros ligandos endógenos inducidos por el estrés. Todas ellas presentan CD8, que puede ser CD8 $\alpha\beta$  o CD8 $\alpha\alpha$ , y algunas receptores de tipo NK, como NKG2D, que modulan sus propiedades funcionales. Los linfocitos T $\gamma\delta$  son necesarios para inducir la diferenciación de células Treg y el mantenimiento de la integridad epitelial (Locke et al., 2006). Tras el reconocimiento de antígenos de la dieta mediante su TCR, las células T $\gamma\delta$  expresan de forma rápida y transitoria el receptor de quimiocinas CCR7 que les permitirá migrar a los nódulos linfáticos donde pueden actuar como CPA e inducir la diferenciación de las células Treg. Además, secretan TGF $\beta$ , que puede intervenir en la reparación del epitelio y en la regulación de la respuesta inmunitaria. Estas funciones son desarrolladas por aquellas células T $\gamma\delta$  que son CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>. Sin embargo, se ha descrito una acción citotóxica de las células T $\gamma\delta$  CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup> frente a los enterocitos mediada por la interacción del receptor NKG2D, presente en algunas de ellas, con su ligando que es la molécula MICA expresada en la

## 1.- INTRODUCCIÓN

membrana de los enterocitos, que lleva a la apoptosis de estas células y la consecuente atrofia vellositaria, observada fundamentalmente en la EC (Hue et al., 2004).

### 1.2A.3. Linfocitos T reguladores.

Clásicamente, se han definido estas células como linfocitos T  $CD4^+$ , que presentan el factor de transcripción denominado FoxP3 (*forkhead box P3*) (Zheng and Rudensky, 2007) y, en ciertos estadios de activación, el marcador de superficie CD25 (Zheng and Rudensky, 2007). Estas células son detectadas primordialmente en la LP y en los FLM, sugiriendo que el TLAI es el principal sitio para la generación periférica de estas células (Sun et al., 2007). Estudios recientes muestran que para la generación del factor de transcripción FoxP3 es necesario la intervención del TGF $\beta$  y del AR. Estas células han sido consideradas como las principales células homeostáticas del organismo y, en particular, del intestino. Realizan su función al bloquear la expansión clonal de las células T clásicas, tanto  $CD4^+$  como  $CD8^+$ , pero además inhiben la producción de IL-2. Modulan la inflamación local, al inhibir las respuestas Th1 y la producción de IFN $\gamma$ . Todas estas funciones las lleva a cabo mediante la producción de citocinas moduladoras como IL-10 y TGF $\beta$  (La Cava et al., 2006).

Otros subtipos de células  $CD4^+$  están también implicadas en la homeostasis intestinal, como las células denominadas Th3 que realizan su función a través de la producción de TGF $\beta$  (Sun et al., 2007). Recientemente, se ha determinado que esta población celular depende, en algún momento, de la presencia de FoxP3, por lo que se ha sugerido que las células Th3 y Treg son la misma población celular.

Además, existe otra población  $CD4^+$  que no expresa el factor de transcripción FoxP3 ni la molécula CD25 en superficie, y que son las principales células que controlan la respuesta inflamatoria frente a los antígenos de la dieta (Gianfrani et al., 2006). Son los denominados linfocitos Tr1, principales productores de IL-10 en el intestino. Cualquier linfocito Th1, Th2 o Th17 bajo ciertas condiciones puede ser productor de IL-10, por lo que las células Tr1 no serían más que linfocitos  $CD4^+$  estimulados crónicamente para reducir la producción de citocinas pro-inflamatorias y el mantenimiento de los niveles de IL-10 (O'Garra and Vieira, 2007). Dentro del intestino, la actividad de estas células no-Treg es más importante que la de las Treg en la tolerancia oral, ya que su número es mucho mayor que el representado por las células  $CD4^+FoxP3^+$ .

Las células CD8<sup>+</sup>, tanto las que son CD8αβ<sup>+</sup> como las homodiméricas CD8αα, actúan como células reguladoras no convencionales, y pueden controlar la respuesta inmunitaria a través de la producción de TGFβ e IL-10, o realizando su acción citotóxica sobre células T efectoras o CPA (La Cava et al., 2006).

### 1.2A.4. Linfocitos B.

Las células B presentan un grado de diferenciación celular muy alto. Son importantes en el mantenimiento de la homeostasis intestinal, ya que la IgA es capaz de interactuar con el antígeno inhibiendo respuestas inmunológicas más severas. Esta interacción se realiza una vez que el antígeno ha sufrido transcitosis epitelial, cuando se encuentra dentro de un enterocito, o tras formar inmunocomplejos con el antígeno en la LP mucosa (Gutzeit et al., 2014).

### 1.2A.5. Células *Natural Killer*.

Las células NK son la principal población dentro de las células linfoides innatas (CLI). Las CLI son poblaciones bien establecidas de reciente identificación que parecen compartir un origen común, derivadas de una población linfoide progenitora Id2-dependiente (Hoyler et al., 2012; Spits and Di Santo, 2011; Veldhoen and Withers, 2010; Wong et al., 2012; Yang et al., 2011), y que se definen por tres características principales: ausencia de receptores antígeno-específicos y funciones de memoria, falta de marcadores fenotípicos de células mieloides, y morfología linfoide (Spits et al., 2013). De hecho, estas células no reconocen patógenos de forma directa, pero responden a los cambios de patrones de citocinas inducidos por infecciones patógenas (Maloy and Powrie, 2011; Spits and Cupedo, 2012; Spits and Di Santo, 2011; Veldhoen and Withers, 2010). El prototipo de población linfoide innata son las células NK y las células inductoras de tejido linfoide (LTi, *lymphoid tissue-inducer*). Las células NK presentan marcadores característicos como CD7<sup>+</sup>, CD103<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup> y CD16<sup>+</sup>, entre otros (Eiras et al., 2000), así como la ausencia del marcador TCR CD3<sup>+</sup>. Juegan un papel importante en la defensa frente a células tumorales y patógenos, especialmente virus, y son capaces de producir citocinas por lo que adquieren una función también reguladora (Kiessling et al., 1975; Pearson et al., 2012). Las células LTi son esenciales para la

## 1.- INTRODUCCIÓN

---

formación de los ganglios linfáticos durante la embriogénesis (Mebius et al., 1997; Pearson et al., 2012).

Recientemente, se han identificado otras poblaciones de CLI que, al igual que las células NK y las LT<sub>i</sub>, dependen de  $\gamma_c$  y de ID2 para su desarrollo. Estas poblaciones de CLI tienen distintos patrones de producción de citocinas que reflejan las distintas subpoblaciones de linfocitos Th (Spits and Di Santo, 2011). Por ejemplo, tras su activación, algunas poblaciones de CLI secretan citocinas asociadas a células Th17 como IL-17 e IL-22, mientras que otras subpoblaciones secretan citocinas de tipo Th2 (IL-5 e IL-13) (Spits and Di Santo, 2011).

Las poblaciones de CLI podrían tener funciones efectoras en la respuesta inmunitaria temprana contra agentes patógenos (Cella et al., 2009; Moro et al., 2010), además de contribuir a la reparación de los tejidos mucosos (Monticelli et al., 2011; Scandella et al., 2008), la contención anatómica de la flora comensal, y el mantenimiento de la integridad epitelial (Sonnenberg et al., 2012). Por otra parte, se han encontrado subpoblaciones de CLI involucradas en varias enfermedades inflamatorias. Por ejemplo, las CLI productoras de IL-17 e IFN $\gamma$  han demostrado ser mediadores de la colitis en un modelo murino de EII (Buonocore et al., 2010), mientras que las CLI productoras de citocinas Th2 causan inflamación pulmonar en ciertos modelos de asma alérgica (Chang et al., 2011). Dentro de las CLI se encuentran también las células T natural killer (NKT).

### 1.2A.6. Células T *Natural Killer*.

Las células NKT son una subpoblación de linfocitos T que expresan receptores característicos de células T y NK (Bendelac et al., 2007; Brigl and Brenner, 2004; Godfrey et al., 2004; Kronenberg, 2005; Van Kaer, 2007). Como las células NK, se engloban dentro del grupo 1 de CLI (Spits et al., 2013) y contienen perforinas y granzimas que permiten su participación en la respuesta inmunitaria innata (Bendelac et al., 2007; Brigl and Brenner, 2004; Godfrey et al., 2004). A diferencia de las células T convencionales que reconocen péptidos unidos a moléculas MHC de clase I o II, las células NKT reconocen estructuras lipídicas y glicolipídicas unidas a moléculas CD1d (Middendorp and Nieuwenhuis, 2009). Se encuentran principalmente en el hígado, bazo y médula ósea, y dependen del timo para su desarrollo. En el intestino, se han descrito varias subpoblaciones de células NKT entre los LIE y en la LP (Middendorp and

Nieuwenhuis, 2009). La activación de las células NKT intestinales contribuye a la inmunidad mucosa frente a bacterias patógenas y comensales. Además, la activación incontrolada o insuficiente de las células NKT puede contribuir a la patogénesis de las enfermedades inflamatorias intestinales (Van Kaer et al., 2011).

Las células NKT se definieron originalmente por la co-expresión del TCR $\alpha\beta$  y receptores de células NK, especialmente NK1.1 en ciertas cepas de ratón, y CD161 en el hombre (Kronenberg, 2005). Sin embargo, las células T convencionales pueden expresar receptores de tipo NK (Bendelac et al., 2007; Tupin et al., 2007). En la actualidad, la clasificación más aceptada es la propuesta por Wingender et al. (Wingender and Kronenberg, 2008) basada en la composición de su TCR y en la molécula presentadora de antígeno que reconocen, distinguiéndose entre cuatro poblaciones (Tabla 1).

	CÉLULAS NKT CANÓNICAS O CLÁSICAS				CÉLULAS NKT VARIABLES O NO CLÁSICAS	
	Células NKT invariantes o iNKT		Células NKT asociadas a mucosa o mNKT		Células NKT variables o vNKT	Células NKT-like o xNKT
	Humano	Ratón	Humano	Ratón	Humano/Ratón	Humano/Ratón
<b>TCR</b>	V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18	V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18	V $\alpha$ 7.2-J $\alpha$ 33	V $\alpha$ 19-J $\alpha$ 33	Variable	Variable
<b>Molécula presentadora de antígeno</b>	CD1d		MR1		CD1d	MHC I/II
<b>Principales ligandos</b>	$\alpha$ GalCer, GSL, iGb3		$\alpha$ ManCer		No determinado	Diversos péptidos
<b>Principales receptores NK</b>	CD56, CD161	NK1.1	CD161	NK1.1	CD161/NK1.1	DX5/NK1.1
<b>Correceptores</b>	CD4, CD8 $\alpha\alpha$ , DN	CD4, DN	CD4, CD8 $\alpha\alpha$ , DN	CD4, DN	CD4, DN	CD4, CD8 $\alpha\alpha$ , DN
<b>Fenotipo en sangre periférica</b>	Efector/memoria		Efector/memoria		Efector/memoria	Efector/memoria /Naive
<b>Requerimientos para su desarrollo</b>	IL-15		Células B con MR1, flora intestinal		No determinado	No determinado
<b>Localizaciones principales</b>	Hígado, timo, médula ósea, bazo, mucosa intestinal y pulmonar		Hígado, mucosa intestinal y pulmonar		Hígado y bazo	Hígado, bazo, médula ósea

**Tabla 1. Características de las diferentes poblaciones de células NKT.** NKT, célula T *natural killer*; MHC, Complejo Mayor de Histocompatibilidad;  $\alpha$ GalCer,  $\alpha$ -GalactosilCeramida; GSL, glicoesfingolípidos; iGb3, isoglobothioxosilceramida;  $\alpha$ ManCer,  $\alpha$ -Manosilceramida; DN, doble negativa.

Las dos primeras tienen un TCR canónico o invariante e interactúan con moléculas no-polimórficas semejantes a las moléculas MHC de clase I (Wingender and Kronenberg, 2008). Una de ellas, denominada células NKT invariantes o células iNKT,

## 1.- INTRODUCCIÓN

incluye células que expresan un TCR semi-invariante compuesto por las cadenas V $\alpha$ 14 - J $\alpha$ 18 y V $\beta$ 8.2, -7, o -2 en ratones, o las cadenas homólogas V $\alpha$ 24 - J $\alpha$ 18 y V $\beta$ 11 en el hombre (Godfrey et al., 2004). La segunda incluye células NKT de mucosa o mNKT, que se caracterizan por expresar un TCR V $\alpha$ 7.2 invariante en ratones, y su homólogo V $\alpha$ 19 en humanos (Middendorp and Nieuwenhuis, 2009). Un tercer grupo, denominado células NKT variables o vNKT, incluye linfocitos NKT reactivos a CD1d pero sin TCR de composición fija (Arrenberg et al., 2009; Chiu et al., 1999). El cuarto grupo, de células xNKT o células NKT-like, es el más heterogéneo por incluir todas las células T que expresan receptores de tipo NK. En este grupo se encuentran las células T que no dependen de la expresión de la molécula CD1d para su desarrollo o reactividad, y pueden reconocer lípidos presentadas por moléculas de la familia CD1 (CD1a, -b, -c), pero cuyo reconocimiento antigénico no se limita a los lípidos sino también a antígenos peptídicos en el contexto de las moléculas MHC de clase I o II (Wingender and Kronenberg, 2008).

### 1.2A.7. Células NKT invariantes.

La fracción más numerosa y mejor estudiada de las células NKT son las denominadas NKT *invariantes* o iNKT. Como se ha comentado antes, estas células se caracterizan por poseer un TCR compuesto por las cadenas V $\alpha$ 14 - J $\alpha$ 18 y V $\beta$ 8.2, -7, o -2 en los ratones o las cadenas homólogas V $\alpha$ 24 - J $\alpha$ 18 y V $\beta$ 11 en el hombre (Godfrey et al., 2004). Las células iNKT reconocen estructuras glicolipídicas, presentadas por la molécula CD1d, homóloga de MHC de clase I (Godfrey et al., 2004). Aunque hay un sorprendente grado de reactividad cruzada entre especies, ya que las células iNKT de ratón pueden reconocer antígenos presentados por moléculas CD1d humanas y viceversa, existen importantes diferencias entre las células iNKT de ambas especies (Treiner and Lantz, 2006).

A medida que se diferencian en el timo, las células iNKT van expresando un patrón de marcadores de superficie (CD69<sup>+</sup>, CD44<sup>alto</sup>, CD11a<sup>alto</sup>, CD62<sup>bajo</sup>, CD122<sup>+</sup>) asociado típicamente a linfocitos T de memoria o activados (Wingender and Kronenberg, 2008). Tras la activación, las células iNKT adquieren rápidamente actividad citotóxica y producen citocinas tanto Th1 (IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ ) como Th2 (IL-4, IL-10 e IL-13) (Coquet et al., 2008), y se ha observado recientemente que algunas iNKT

pueden producir IL-17 (Coquet et al., 2008; Michel et al., 2007). Las células iNKT pueden estar implicadas en las primeras fases de una gran variedad de respuestas inmunitarias, desde la tolerancia oral hasta el desarrollo de autoinmunidad, incluyendo respuestas frente a agentes patógenos y tumorales (Kronenberg, 2005; Tupin et al., 2007).

Tras desarrollarse en el timo, una buena parte de las células iNKT permanece allí y el resto emigran a la periferia, formando una subpoblación relevante de células T en la médula ósea, bazo, sangre, e hígado, siendo más raras en los ganglios linfáticos (Van Kaer et al., 2011). Algunas de estas células llegan a la mucosa intestinal y pulmonar. Curiosamente, el número de células iNKT es menor en la mayoría de los órganos del hombre, comparado con los ratones, y su prevalencia varía mucho entre sujetos, por razones aún sin aclarar (Van Kaer et al., 2011). Estudios recientes muestran que el envejecimiento produce un descenso rápido y significativo del número de células iNKT en sangre periférica, asociado a un aumento en la proporción de células iNKT CD4<sup>+</sup> y una disminución en las células iNKT doble-negativas. Además, las células iNKT de sujetos de edad avanzada secretan más IL-4 que las de los sujetos jóvenes (Jing et al., 2007). Estos resultados podrían explicar también los cambios en el perfil de citocinas Th1/Th2 relacionados con la edad y arrojar luz sobre el mecanismo de inmunosenescencia. Dada la importancia de las células iNKT en el inicio y regulación de la respuesta inmunitaria, también podría ayudar a entender el aumento de incidencia de enfermedades infecciosas y cancerosas, y de la severidad de los procesos autoinmunes en las personas de edad avanzada (Jing et al., 2007; Peralbo et al., 2006).

Se han identificado varios antígenos lipídicos o glicolipídicos que pueden ser presentados por CD1d y activar las células iNKT. El antígeno prototípico es KRN7000, una  $\alpha$ -galactosilceramida ( $\alpha$ -GalCer) descubierta originalmente en una esponja marina (Kawano et al., 1997). La hipótesis actual establece que las células iNKT son capaces de reconocer estructuras glicolipídicas naturales presentes en varios agentes bacterianos patógenos, tales como *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia bacteria*, *Streptococcus pneumoniae* (Kinjo et al., 2005) y *Bacteroides fragilis* (Wieland Brown et al., 2013). Además las células iNKT maduras pueden, en algunas circunstancias, reconocer glicolípidos endógenos unidos a CD1d. Hasta la fecha, el mejor candidato es un glicoesfingolípido presente en los lisosomas de algunas células, el isoglobotrihexosilceramida (iGb3) (Zhou et al., 2004). Las células iNKT también pueden ser activadas de una manera directa a través de citocinas proinflamatorias, tales

## 1.- INTRODUCCIÓN

---

como IFN $\gamma$ , IL-12 e IL-18, las cuales son producidas por macrófagos y CD de manera temprana tras cualquier infección de origen bacteriano o vírico (Lawson, 2012).

### 1.3. Células iNKT en el intestino humano.

El porcentaje de células iNKT presentes en el intestino humano es un tema controvertido. Hasta la fecha, estas células sólo pueden detectarse inequívocamente por cuantificación de Ácido Ribonucleico mensajero o ARNm codificante para las cadenas invariantes del TCR o por citometría de flujo con tetrámeros de CD1d- $\alpha$ GalCer (Wingender and Kronenberg, 2008). Por análisis de expresión de ARNm, las proporciones de células T que expresan CD161 respecto al total de linfocitos son: 50-70 % de LIE de intestino delgado (Iiai et al., 2002; O'Keeffe et al., 2004), 40-45 % de LIE de intestino grueso (Iiai et al., 2002; O'Keeffe et al., 2004), y 9 % de linfocitos de la LP del intestino grueso (Fuss et al., 2004). Sin embargo, sólo un 1.6 -1.7 % de las células CD3 $\epsilon$ /CD161 intestinales expresa V $\alpha$ 24 (Iiai et al., 2002; O'Keeffe et al., 2004), y los datos de inmunohistoquímica sugieren que la mayoría de estas células están en la LP (Grose et al., 2007a). Mediante tetrámeros de CD1d- $\alpha$ GalCer para citometría de flujo, se puede estimar que la proporción de células iNKT en el intestino humano es del 0,4 % del total de células T y están localizadas principalmente en la LP (Fuss et al., 2004). Sin embargo, a pesar de su número bajo, estas células son capaces de producir gran cantidad de citocinas tras ser activadas con  $\alpha$ -GalCer (O'Keeffe et al., 2004).

La expresión de CD1d es un requisito previo para la activación antígeno-específica de las células iNKT (van Dieren et al., 2007). Esta es una molécula semejante a las del MHC de clase I, consistente en una cadena ligera ( $\beta$ 2-microglobulina) asociada covalentemente a una cadena pesada (Zeng et al., 1997), y está relacionada estructuralmente con las moléculas HLA-A, HLA-B, y HLA-C presentes en las CEI (Brigl and Brenner, 2004). CD1d es expresada por las CPA profesionales, como células dendríticas, macrófagos y células B, así como por CPA no profesionales, como hepatocitos y CEI (Balk et al., 1994; Bleicher et al., 1990; Blumberg et al., 1991).

Un aspecto controvertido de las CEI humanas es la expresión de CD1d, debido a que la mayoría de estas células expresan una forma de CD1d no asociada a  $\beta$ 2-microglobulina, de localización principalmente intracelular y expresión superficial limitada a la zona apical (Balk et al., 1994; Kim et al., 2000; Kim et al., 1999; Somnay-

Wadgaonkar et al., 1999). Aunque su función no está clara, y no hay datos que confirmen el reconocimiento de esta forma de CD1d por las células iNKT, se ha sugerido que algunas células T, probablemente células vNKT, sí lo hacen (Balk et al., 1994; Cardell et al., 1995; Panja et al., 1993). Las CEI expresan débilmente la forma nativa de la molécula CD1d, preferentemente en la zona basal (Somnay-Wadgaonkar et al., 1999). Sin embargo, estas CEI humanas pueden activar células iNKT *in vitro* a través de CD1d (Pellicci et al., 2005; Perera et al., 2007). También se ha descrito una vía de retroalimentación dependiente de CD1d que participa en la señalización y producción de IL-10 en la mucosa intestinal a través de la activación de CEI (van Dieren et al., 2007). La abundancia de CD1d en el intestino y la potente activación dependiente de CD1d de las células iNKT, sugieren su implicación en la homeostasis intestinal, en la regulación de la colonización bacteriana intestinal y en la protección frente a patógenos como *Salmonella typhimurium* y *Toxoplasma gondii* (Berntman et al., 2005; Nieuwenhuis et al., 2009; Ronet et al., 2005).

La capacidad del sistema inmunitario para discriminar entre antígenos patógenos y no patógenos es la base de la tolerancia inmunológica. Un componente importante de la tolerancia oral frente a los antígenos de la dieta y la flora saprófita está representado por las células intestinales con función reguladora, como los linfocitos Treg productores de IL-10, las CD tolerogénicas y las células iNKT (La Cava et al., 2006). Los linfocitos Treg pueden inhibir la actividad de las células iNKT por contacto celular (Azuma et al., 2003), mientras que las células iNKT incrementan la actividad de las células reguladoras intestinales mediante la producción de citocinas como IL-2 y TGF $\beta$  (Jiang et al., 2005). Los linfocitos Treg son capaces de suprimir las respuestas Th1 y Th2 (Sakaguchi, 2004), mientras que las células iNKT suprimen la activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y, por tanto, la respuesta Th1, y aumentan o suprimen la respuesta de tipo Th2 (Beaudoin et al., 2002; Miyamoto et al., 2001). Además, las células iNKT son capaces de inducir la maduración de CDi hacia CD tolerogénicas (La Cava et al., 2006). Cuando los mecanismos de tolerancia fallan se desencadena una respuesta inmunitaria inadecuada frente a los antígenos alimentarios y la flora saprófita, dando lugar a patologías inflamatorias del intestino como la EC o la EII respectivamente.

## 1.- INTRODUCCIÓN

### 1.3A. Papel de las células iNKT en la patología intestinal

No hay muchos estudios sobre la activación de las células iNKT en pacientes con EII, sin embargo, los estudios realizados en modelos murinos y el conocimiento actual de la biología de las células iNKT sugieren que estas células juegan un papel relevante. Además, se ha observado un aumento de la expresión de CD1d en el epitelio del íleon terminal de pacientes con enfermedad de Crohn (ECr), y en la zona cecal afectada de pacientes con Colitis Ulcerosa (CU), lo que podría aumentar el reclutamiento de células proinflamatorias dependientes de CD1d y la destrucción de la mucosa intestinal en la EII (Page et al., 2000). Sin embargo, un estudio más reciente sugiere que, al contrario de las CEI de pacientes sanos, las CEI de pacientes con EII no expresan CD1d, dando lugar a una regulación anómala de la función de las células NKT (Perera et al., 2007).

En estudios clínicos se ha observado una reducción significativa de células iNKT en sangre periférica de pacientes con ECr, cuantificado como células V $\alpha$ 24/V $\beta$ 11<sup>+</sup> o células reactivas frente al tetramero CD1d- $\alpha$ GalCer (Grose et al., 2007b; van der Vliet et al., 2001), así como una expresión reducida de V $\alpha$ 24 y del número de células iNKT en el intestino de estos pacientes (Grose et al., 2007b). Sin embargo, podría haber una activación aberrante de las células iNKT debido a que estas células pueden producir grandes cantidades de IFN $\gamma$  mediado por IL-12 (O'Keeffe et al., 2004). Curiosamente, las CEI del íleon terminal, ubicación preferente donde se asienta la ECr, contienen numerosos lisosomas con contenido lipídico que pueden actuar como potentes activadores de las células iNKT (Marin et al., 1984; Thyberg et al., 1981). En la CU se han encontrado células NKT productoras de IL-13. Al contrario que en el modelo murino de colitis inducida por oxazolona, estas células no expresan la cadena invariante V $\alpha$ 24 del TCR, por lo que no se trata de iNKT, aunque su activación depende de CD1d (Heller et al., 2002).

Las características innatas y adaptativas de las células iNKT, y su capacidad para producir grandes cantidades de IL-4 e IFN $\gamma$  sugieren también su implicación en la EC (Grose et al., 2007a; van der Vliet et al., 2004; van der Vliet et al., 2001). Los diferentes estudios de cuantificación de células iNKT circulantes e intestinales realizados en pacientes celíacos han sido contradictorios (Grose et al., 2007a; van der Vliet et al., 2001). En algún caso se ha descrito una disminución de las células iNKT en el duodeno

de los pacientes (Calleja et al., 2011; Grose et al., 2007a). Hasta el momento no existe un consenso ni acerca del número de las iNKT en el duodeno de los pacientes celíacos, ni acerca de su función o participación en la etiopatogenia de la enfermedad.

### **1.4. Principales enfermedades inflamatorias intestinales en humanos.**

#### **1.4A. Enfermedad Inflamatoria Intestinal.**

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) incluye dos entidades denominadas enfermedad de Crohn (ECr) y colitis ulcerosa (CU). En ambas se produce una respuesta inmunitaria exacerbada frente a la flora bacteriana saprófita en personas genéticamente susceptibles, con infiltración de linfocitos T en la pared intestinal, que se acompaña de inflamación crónica y de lesión tisular, aunque existen diferencias tanto clínicas como morfológicas: en la ECr se ven afectadas todas las capas del final del intestino delgado o principio del grueso (íleon-colon), aunque pueden existir alternativamente tramos con histología normal y alterada. La CU, sin embargo, es limitante por su actuación en el colon, siendo su distribución más homogénea y continua, y afecta básicamente a la mucosa y submucosa del intestino (Barbara et al., 2014; Carter and Eliakim, 2014). Ambas formas pueden asociarse con manifestaciones extra-intestinales prominentes, como fiebre, pérdida de peso, retraso en el crecimiento, artralgias o artritis, lesiones mucocutáneas, etc., y una mayor incidencia de cáncer gastrointestinal que se da especialmente en la CU (Ekbom et al., 1990; Rothlin et al., 2014).

Dada la heterogeneidad de presentación es recomendable utilizar la clasificación del fenotipo de Montreal (2005) que actualiza las clasificaciones anteriores de Roma y Viena, con utilidad epidemiológica, clínica y pronóstica. En la ECr, la clasificación se basa en la edad al diagnóstico (A1: < 16 años, A2: 17-40 años, A3: > 40 años), la extensión (L1: íleon terminal, L2: colon, L3: íleon terminal y colon, añadiéndose L4 si hay afectación del tracto digestivo alto), y en el patrón de la enfermedad (B1: no estenosante no penetrante, B2: estenosante, B3: penetrante). Por último, si coexiste enfermedad de Crohn perianal se añade +p. La clasificación permite predecir el curso evolutivo de la enfermedad, siendo factores pronósticos de enfermedad agresiva el debut en edad temprana, la localización ileocólica y/o perianal y el patrón penetrante (Vermeire et al., 2012).

## 1.- INTRODUCCIÓN

---

En lo que respecta a CU, la clasificación distingue según la extensión de la afectación macroscópica de la mucosa, entre proctitis (E1), colitis izquierda o distal al ángulo esplénico (E2) y colitis extensa, proximal al ángulo esplénico (E3). La inflamación puede sufrir una extensión o una regresión a lo largo del tiempo y el riesgo de extensión proximal de la proctitis es superior al 40% en 10 años de seguimiento. Además, distingue según la gravedad en S0 (quiescente), S1 (leve), S2 (moderada) y S3 (grave). La gravedad del proceso depende del número de deposiciones, sangre en heces, hemoglobina, fiebre y frecuencia cardíaca (Vermeire et al., 2012).

Ambas enfermedades afectan igualmente a hombres y mujeres. La CU puede aparecer a cualquier edad, mientras que en la ECr, aunque puede afectar a ancianos y a niños, la mayoría de los casos se diagnostican entre los 15-35 años, según la Fundación Americana de Crohn y Colitis (2007). En España, los pacientes de ECr se describen con una incidencia de 10 casos por 100.000 habitantes, mientras que la CU es de 8-9 casos en 100.000 habitantes. La prevalencia es de 150-170 por 100.000 habitantes en la CU, y 110-125 por 100.000 en la ECr (Cerba Internacional Lah. IBD Test. 2005. [www.cerba.com](http://www.cerba.com)).

### 1.4A.1. Inmunopatogenia de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

En la actualidad, nadie duda de que la EII, en sus variantes fundamentales (la ECr y la CU), goza de un cierto componente hereditario no mendeliano realizado a través de un impacto poligénico complejo, cuyos protagonistas se están empezando a conocer (Cho, 2004; Duerr, 2003; Newman and Siminovitch, 2005).

El primer protagonista es el gen NOD2 (dominio de oligomerización por unión de nucleótidos que contiene la proeína 2, *nucleotide oligomerization domain 2*), relacionado con el aumento de la susceptibilidad a padecer ECr. Actualmente rebautizado como dominio reclutador de Caspasa 15 o CARD 15 (*caspase recruitment domain 15*), se localiza en el cromosoma 16q1.2. En condiciones normales, el gen NOD2/CARD15 codifica la síntesis de una proteína que actúa como receptora citosólica, en células del sistema inmunitario innato (macrófagos y CD) de peptidoglucanos bacterianos a través de su componente MDP (Duerr, 2003; Newman and Siminovitch, 2005). En el año 2004, 2 grupos de investigadores comunicaron la asociación entre mutaciones de este gen y la aparición de una ECr de localización ileal y evolución fibroestenótica (Bouma and Strober, 2003; Grimm and Pavli, 2004). Aunque

se ha descubierto una treintena de posibles mutaciones del gen NOD2/CARD15, hoy se sabe que sólo 3 de ellas se asocian a pacientes afectados por ECr (Duerr, 2003).

En la región IBD3 (cromosoma6p1.3) están situados los genes que codifican la síntesis de los HLA de clase II y los de la familia TNF. Al revés de lo que ocurre con otras enfermedades de patogenia inmunitaria (artritis reumatoide, diabetes mellitus tipo 1, esclerosis múltiple, etc.), la asociación entre genes del sistema HLA y la incidencia de la EII es poco consistente. De todas maneras, la CU se ha asociado al genotipo HLA-DR2 (DRB1\* 1502) en pacientes japoneses, mientras que en enfermos europeos la CU parece asociarse discretamente al genotipo HLA-DR3 (DRB1\* 0103). Las asociaciones de los antígenos de clase II del sistema HLA a la ECr son menos convincentes, aunque parece que el genotipo HLA-DR1 se ha relacionado con esta variante de la EII (Ahmad et al., 2006; Lakatos et al., 2006; Pena, 2006).

También se han comunicado alteraciones puntuales en la expresión de algunas proteínas de las familia TLR en la EII. Así, parece que la proteína TLR-3 se expresa de manera reducida en las CEI de pacientes con ECr, sin modificación sensible en la CU. Por otra parte, se ha comunicado una sobreexpresión de la proteína TLR-4 en las CEI, tanto en la ECr como en la CU. Y también se ha publicado que la presencia de ciertos polimorfismos genéticos de los receptores TLR-1, TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-6 y TLR-9 se asocia a la EII. De todas maneras, hoy se desconoce el papel patogénico que podrían desempeñar todas estas variantes mutacionales en la EII (Cario, 2005; Lakatos et al., 2006).

Tanto en la CU como en la ECr se produce una respuesta aberrante mediada por células CD4<sup>+</sup> que se encuentran tanto en la LP como en el epitelio, y cuya acción se dirige contra la microbiota intestinal (Abraham and Cho, 2009; Xavier and Podolsky, 2007). Aunque ambas enfermedades comparten mecanismos patogénicos, la respuesta inmunológica que se produce esta mediada por diferentes tipos de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. La respuesta de tipo Th1 está potenciada en la ECr, con un aumento de expresión de IFN $\gamma$  y TNF (Hue et al., 2006; Uhlig et al., 2006). Sin embargo, en la CU, el patrón de citocinas es de tipo Th2, atípico, con aumento de IL-5 o IL-13 (Targan and Karp, 2005). Se ha observado que la IL-6 está aumentada en ambas enfermedades (Uhlig et al., 2006).

En la ECr se describe además la sobre-expresión de IL-12 e IL-23, principalmente, por los macrófagos. Esta expresión aumentada se acompaña también del aumento de la cadena IL-12R $\beta$ 2 en los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. La unión entre la citocina

## 1.- INTRODUCCIÓN

---

y su receptor específico, provoca la activación de factores de transcripción tipo STAT3 o STAT4 en estas células, pudiendo ser uno de los mayores responsables, junto con el STAT1 (inducido por IFN $\gamma$ ) de la polarización hacia Th1 en esta inflamación (Mudter et al., 2005). Existe, a su vez, una respuesta exagerada de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IFN $\gamma$  (Th1), y del factor de transcripción T-Bet (Matsuoka et al., 2004; Szabo et al., 2000), que se asocia con la producción de IFN $\gamma$  por células Th1, a la vez que suprime una respuesta Th2. Recientemente se ha demostrado que la administración de anticuerpo anti-IL-12p40 favorece la remisión clínica en estos pacientes, lo que podría significar que no sólo la IL-12, sino también la IL-23 con la que comparte esta subunidad, son importantes en el control de la respuesta Th1 de la ECr (Matsuoka et al., 2004). Nuevos estudios han identificado un infiltrado de células Th17 en los pacientes con ECr, lo que sugiere una mayor complejidad en la respuesta inmunitaria. Esto, sumado al aumento de IL-23, citocina inductora de respuestas Th17, junto con alteraciones en el gen que codifica para el receptor de la IL-23, constituyen uno de los principales pilares inmunopatogénicos en la ECr (Duerr et al., 2006).

Los estudios realizados hasta ahora sugieren que la CU está caracterizada por la sobre-expresión de citocinas Th2 como la IL-4, IL-5 o la IL-13 (Mudter et al., 2005). En esta enfermedad, el IFN $\gamma$  no parece estar elevado cuando se compara con individuos sanos. En modelos animales experimentales de CU inducidos por oxazolona, se ha visto que la respuesta inmunitaria está mediada por células NKT, que producen niveles elevados de IL-13, citocina que induce la expresión de TGF $\beta$  y promueve fibrosis. La vía de activación intracelular de los linfocitos T sería a través de la IL-13R $\beta$ 2 (expresado en el epitelio del colon) y el STAT6. Tanto la eliminación de las células NKT como la neutralización de la IL-13 previene el desarrollo de la CU (Monteleone et al., 2006). El papel de estas citocinas, como de las mutaciones genéticas del NOD2/CARD15, podrían ser alguno de los pilares relacionados con el desarrollo de una respuesta inmunológica frente a la flora bacteriana del intestino, y la pérdida de la tolerancia a la misma (Newman and Siminovitch, 2005).

Este ambiente pro-inflamatorio enriquecido por las diferentes citocinas producidas en la respuesta inmunitaria de la EII, fundamentalmente la IL-23, está implicado en el desarrollo, activación y supervivencia de diferentes poblaciones de LIE (Kunisawa et al., 2007; Schaefer et al., 2010). Liu et al. (Liu et al., 2011) demostraron recientemente que los LIE aislados de pacientes con EII tenían una mayor capacidad citolítica frente a las CEI que no se encontraba en los controles sanos. Además, esta

actividad citolítica se incrementaba al añadir IL-23 al cultivo y llevaba asociado un aumento de la producción de citocinas pro-inflamatorias (IFN $\gamma$ , TNF, IL-2 e IL17A). Todo ello parece indicar la implicación directa de los LIE en la EII.

El diagnóstico diferencial de la EII, actualmente enfocado en exámenes de tipo endoscópico y anatomopatológico, no logra discriminar completamente entre pacientes con ECr o CU (Carter and Eliakim, 2014). El diagnóstico de las EII basado en principios inmunológicos ha comenzado a investigarse, por ejemplo, con la evaluación de los marcadores serológicos, tales como los autoanticuerpos tipo IgG contra neutrófilos (pANCA) y contra *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) (Nakamura et al., 2003). Los pANCA se relacionan con cuadros de CU mientras que los ASCA han sido asociados principalmente a ECr. Sin embargo, estos marcadores coexisten en pacientes con ECr y CU, restándole valor como diagnóstico diferencial (Nakamura et al., 2003).

Recientemente, Beltrán et al. han propuesto realizar el diagnóstico diferencial de las EII mediante la correlación entre la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup>/IFN $\gamma$ <sup>+</sup> en sangre. Los resultados obtenidos mediante técnicas de citometría de flujo indican que pacientes con ECr en fase activa presentan niveles elevados de linfocitos T CD4<sup>+</sup>/IFN $\gamma$ <sup>+</sup>, mientras que la determinación en pacientes con CU o controles sanos demostró un predominio de linfocitos T CD4<sup>+</sup>/IFN $\gamma$ <sup>-</sup> (Beltrán C., et al. Falk Symposium 151, Marzo 2006, Sydney, Australia).

El estudio del componente inmunológico involucrado en la fisiopatología de la EII es un ámbito que paulatinamente está comenzando a expandirse y, con un enfoque apropiado podría reportar grandes beneficios en cuanto al diagnóstico y adecuado tratamiento de pacientes con esta patología. Aunque no se conoce muy bien el papel que juegan los LIE en los mecanismos inmunopatogénicos de la EII, el estudio de las alteraciones que sufren estas poblaciones puede llevarnos a un mejor conocimiento de la enfermedad, así como al desarrollo de nuevos métodos diagnósticos.

### **1.4B. Enfermedad celíaca.**

La Enfermedad Celíaca (EC) es una enfermedad inflamatoria crónica del intestino delgado debida a una respuesta inmunológica inadecuada frente al gluten de trigo y proteínas relacionadas de la cebada, el centeno y ciertas avenas (Abadie et al., 2011; Jabri and Sollid, 2009), que afecta a individuos genéticamente predispuestos en cualquier época de la vida. Es un trastorno frecuente con una prevalencia estimada

## 1.- INTRODUCCIÓN

cercana al 1% en la mayoría de las poblaciones estudiadas (Abadie et al., 2011; Dube et al., 2005; Koning, 2005), aunque sólo 1 de cada 7-10 casos ha sido diagnosticado (Catassi et al., 1994).

### 1.4B.1. Inmunopatogenia de la enfermedad celíaca.

La EC es un modelo de gran interés para estudiar cómo la interacción entre factores genéticos y ambientales lleva a la pérdida de tolerancia oral a una proteína de la dieta, como es el gluten (Abadie et al., 2011; Jabri and Sollid, 2009). Se ha avanzado mucho en el conocimiento de la patología molecular de la EC, en especial con la identificación de los heterodímeros HLA-DQ2 y DQ8 y su papel en la presentación de gluten a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos (Arentz-Hansen et al., 2000), y de la acción directa del gluten sobre el epitelio (Hue et al., 2004; Maiuri et al., 2003; Meresse et al., 2006). La inflamación mucosa y el desarrollo de la lesión intestinal son secundarios a la activación secuencial de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa, que conducen a la alteración de la producción local de citocinas por los linfocitos T (Jabri and Sollid, 2006; Meresse et al., 2009).

El modelo patogénico más aceptado integra factores que actúan tanto en el epitelio como en la LP, como la digestión incompleta y el transporte transepitelial de péptidos (Luciani et al., 2009; Matysiak-Budnik et al., 2003; Zimmer et al., 2010), el efecto tóxico directo del gluten sobre el epitelio, la proliferación y activación de LIE (Meresse et al., 2006), y el reconocimiento de péptidos de gluten por linfocitos T específicos con restricción HLA-DQ2 tras ser modificados por la transglutaminasa tisular (TG2) (Kagnoff, 2007). La principal laguna en el conocimiento de la patogenia de la EC es explicar por qué sólo unos pocos individuos portadores del HLA de riesgo desarrollan la enfermedad. Es posible que otros factores no sólo genéticos, sino también ambientales influyan en la capacidad individual de inducción y control de la respuesta innata, y en la susceptibilidad del individuo.

Las principales familias de proteínas del gluten de trigo (gliadinas y gluteninas), y sus homólogos en la cebada y centeno, denominadas prolaminas por su alto contenido en los aminoácidos glutamina y prolina (Shewry and Halford, 2003; Sollid et al., 2012), contienen fragmentos nocivos para el intestino celíaco. Se han identificado dos tipos de péptidos, *inmunogénicos*, que estimulan linfocitos T del intestino o sangre periférica de los pacientes celíacos con restricción DQ2/DQ8, y pueden ser epítomos

inmunodominantes (como los residuos 57-89 de  $\alpha$ -gliadina, 33mer) (Arentz-Hansen et al., 2002; Kagnoff, 2007; Sollid et al., 2012; Vader et al., 2002); y péptidos *tóxicos* (residuos 31-43/49, 19mer) de acción directa sobre el epitelio, que es independiente de los linfocitos T (Jabri and Sollid, 2006; Maiuri et al., 2003). No todos los cereales contienen la misma proporción de péptidos de cada tipo, ni la misma cantidad relativa de gluten, de ahí las variaciones en su capacidad patogénica.

La EC está fuertemente asociada con genes HLA (locus CELIAC1, cromosoma 6p21): la mayoría de los pacientes celíacos muestran una variante de la molécula HLA-DQ2 codificada por los alelos DQA1\*05 y DQB1\*02, y el resto son DQ8 (DQA1\*03, DQB1\*0302), o son portadores de algún alelo aislado del DQ2 (Garrote et al., 2008; Sollid and Lie, 2005; Sollid and Thorsby, 1993). Estos genes muestran un efecto dosis mediado por una presentación de péptidos, que es más eficaz en los homocigotos HLA-DQ2. Aunque el 25% de la población es portadora de DQ2, sólo un 1% desarrolla la EC (Jabri and Sollid, 2006; Sollid and Lie, 2005). Estudios de genoma completo han identificado otras regiones que incluyen genes de susceptibilidad, muchos de ellos relacionados con la función inmunitaria (van Heel et al., 2007), y que podrían ser compartidos también con otras enfermedades crónicas de base inmunológica, como la diabetes mellitus (Smyth et al., 2008).

### 1.4B.1.1. Inmunidad innata frente al gluten.

Péptidos de gluten como el p31-43/49 (19mer) de la  $\alpha$ -gliadina pueden dañar directamente el epitelio intestinal al activar mecanismos de la inmunidad innata, con producción de IL-15. En la EC, hay expresión de IL-15 tanto en los enterocitos del epitelio como en las células mononucleares de la LP mucosa (Maiuri et al., 2000; Mention et al., 2003). La IL-15 es el factor clave dentro de la respuesta innata en la EC ya que favorece la supervivencia, activación y proliferación de los LIE, además de controlar la expansión clonal de los LIE TCR $\gamma\delta$  (Hue et al., 2004; Meresse et al., 2004). Además, esta citocina produce el aumento de la expresión de NKG2D y CD94-NKG2A en la superficie de los LIE, cuyos ligandos son las moléculas MICA/B y HLA-E, respectivamente, expresadas por los enterocitos en situaciones de estrés (Jabri et al., 2000; Mention et al., 2003; Meresse et al., 2004). La interacción de las moléculas NKG2D y MICA/B favorece la reprogramación NK de los LIE al activar cascadas de señalización intracelular de perforinas/granzimas y de Fas/FasL que contribuyen a

## 1.- INTRODUCCIÓN

---

desencadenar la inflamación y la citotoxicidad sobre los enterocitos (Di Sabatino et al., 2006; Ebert, 2005; Meresse et al., 2004), conduciendo al aplanamiento de las vellosidades, lesión característica de la EC. Sin embargo, la interacción de NKG2A con su ligando HLA-E tendría una función reguladora (Bhagat et al., 2008).

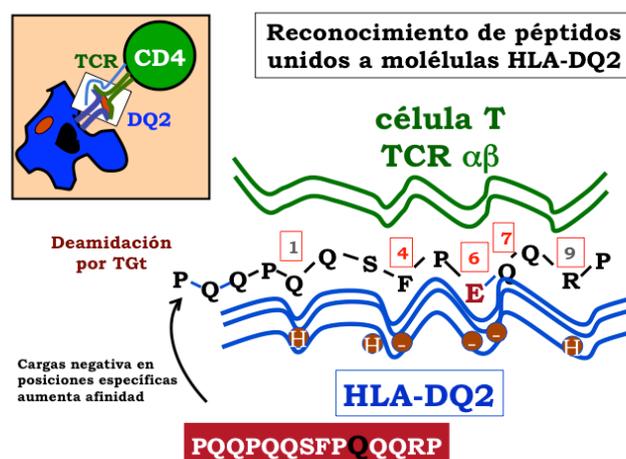
La IL-15 produce la secreción de mediadores de inflamación no específicos, como ácido araquidónico y leucotrienos, por parte de los LIE. También induce la formación de la enzima Óxido Nítrico Sintasa inducible (iNOS) por células de la LP (De Stefano et al., 2006) mediante un mecanismo dependiente del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) (Clemente et al., 2003). Todo estos mecanismos favorecen el aumento de la permeabilidad epitelial y el paso del gluten hacia la LP.

Recientemente se ha conocido que los péptidos de gliadina captados por las células epiteliales mediante endocitosis llegan hasta las vesículas paranucleares (endosomas tardíos y lisosomas), sin embargo, en vez de ser degradados en los lisosomas, el péptido 19mer se acumula allí por causas aún desconocidas, lo que provoca un microambiente pro-oxidativo que induce la activación de la TG2 y la degradación del receptor de glitazona o PPAR $\gamma$  (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma*), una molécula capaz de modular la inflamación intestinal. Este mecanismo podría explicar porqué los pacientes celíacos recaen tras la reintroducción del gluten, incluso antes de que aparezcan signos de inflamación (Luciani et al., 2009).

### 1.4B.1.2. Respuesta inmunitaria adaptativa frente al gluten.

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos de la LP reconocen péptidos sólo cuando son presentados junto a moléculas HLA-DQ2/DQ8 por las CD (Lundin et al., 1993; Sollid, 2002). Estas moléculas disponen de una *hendidura* de unión a péptidos con propiedades únicas para acomodar secuencias peptídicas: DQ2 tiene preferencia por aminoácidos de carga negativa en posiciones centrales (P4, P6, P7), y DQ8, por posiciones más externas (P1, P9) (van de Wal et al., 1998). De forma natural, las proteínas del gluten tienen pocas cargas negativas, sin embargo, la TG2 liberada durante la inflamación es capaz de inducir la conversión de residuos de glutamina en ácido glutámico en secuencias del tipo QXP (Q=glutamina, P=prolina, X=otro aminoácido) (Fleckenstein et al., 2004; Molberg et al., 1998) (figura 2).

Debido a su alto contenido en glutamina y prolina, los péptidos de gluten son resistentes a la proteólisis por enzimas digestivos, formándose fragmentos grandes que contienen varios motivos QXP, los substratos preferidos de la TG2 (Arentz-Hansen et al., 2000; Hausch et al., 2002), como el péptido de 33 aminoácidos (p57-89 de la  $\alpha$ -gliadina, 33mer), cuya inmunogenicidad para los linfocitos T del intestino celíaco aumenta tras la desaminación por TG2 (Shan et al., 2002). La activación de estos linfocitos T CD4<sup>+</sup> reactivos al gluten conduciría a una respuesta proinflamatoria dominada por la producción de IFN $\gamma$ .



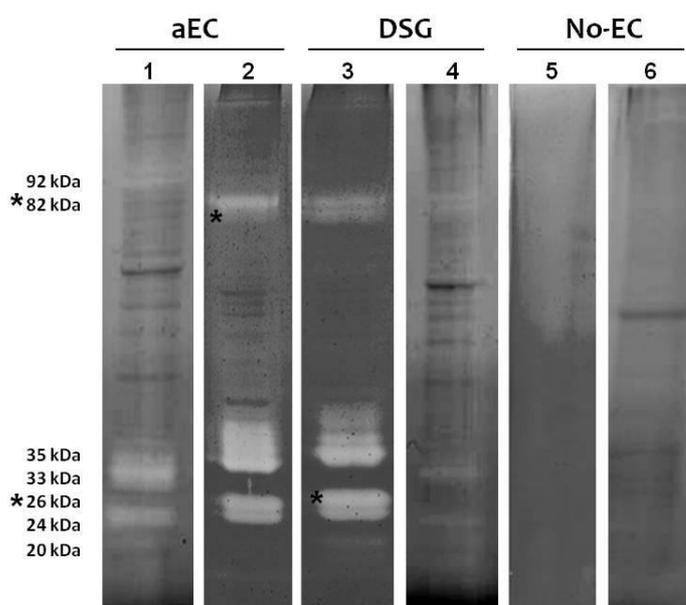
**Figura 2:** La molécula HLA-DQ sirve de elemento de restricción en el reconocimiento de epitopos de gluten por los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Representación esquemática de la interacción entre un epítipo (PQQPQQSFPQQRP) de la  $\alpha$ -gliadina y la molécula HLA-DQ2, con posiciones de anclaje (4, 6, 7) que tienen preferencia por cargas negativas. La TG2 induce la sustitución de glutamina de carga positiva por ácido glutámico de carga negativa (Q=Glutamina, E=Ácido glutámico, P=Prolina).

En la EC en fase activa, se observa un aumento del número de células plasmáticas en la LP (Farstad et al., 1997), y la EC se caracteriza por la presencia de anticuerpos séricos frente a distintas moléculas propias y extrañas (Dieterich et al., 2000). Los linfocitos B son CPA profesionales. Hay pocos linfocitos B vírgenes o de memoria, y la mayoría son plasmablastos o células plasmáticas con escasa expresión de moléculas HLA-clase II (Farstad et al., 2000). Los linfocitos B podrían jugar un papel importante como CPA en los nódulos linfoides regionales para la amplificación de la respuesta de células T frente al gluten. Los linfocitos B específicos para TG2 estimularían preferentemente a los linfocitos T reactivos frente a péptidos de gliadina desaminados, lo que explicaría por qué los anticuerpos frente a estos péptidos son buenos marcadores de *predicción* de la EC (Qiao et al., 2012).

## 1.- INTRODUCCIÓN

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio detectaron en el plasma de pacientes celíacos, anticuerpos IgA específicos frente a la forma desaminada de un péptido de 8 aminoácidos (8mer, FPLQPQP; 8mer desaminado, FPLQPEQP), derivada del péptido nativo que se generó durante la degradación duodenal específica de la gliadina, confirmando que la forma desaminada por la TG2 del 8mer es un epítipo reconocido por los anticuerpos IgA encontrados en el plasma de estos pacientes, con habilidad para desencadenar una respuesta humoral *in vivo* en estos pacientes (Vallejo-Díez et al., 2013).

El péptido 8mer se identificó durante el análisis del patrón de degradación de la gliadina, que resultó ser específico de pacientes celíacos, compuesto por siete proteasas con pesos moleculares entre 20 kDa y 92 kDa 11 (Bernardo et al., 2009) (figura 3).



**Figura 3: Patrón de degradación de la gliadina específico de pacientes celíacos.** Zimograma de gliadina con extractos proteicos de biopsias intestinales de pacientes celíacos en actividad (aEC, líneas 1 y 2), pacientes celíacos en dieta sin gluten (DSG, líneas 3 y 4) y pacientes control no celíacos (No-EC, líneas 5 y 6). El patrón de degradación de gliadina, caracterizado por 7 proteasas duodenales específicas de los pacientes celíacos (con pesos moleculares de entre 92 y 20 kDa), se encontró en los pacientes aEC y DSG, mientras que estaba ausente en los pacientes No-EC. El análisis por MALDI-TOFF de las banda de 26 kDa de un paciente DSG (línea 3) y de la banda de 82 kDa de un paciente aEC (línea 2) permitió la identificación de tres péptidos: 8-, 15- y 18-mer (Bernardo et al., 2009).

Este péptido 8mer se encuentra únicamente en prolaminas y gluteninas que resultan tóxicas para los celíacos. Entre las más de 250 secuencias homólogas al 8mer que se revisaron, la mayoría se encontraban en las  $\omega$ -prolaminas (gliadina y secalina).

Para estudiar si el 8mer podría estar incluido en péptidos tóxicos ya descritos en la EC, se realizó una búsqueda entre los epítomos de células T reactivas frente al gluten más relevantes en la EC 6 y muchos de estos epítomos se superponen o son muy similares al 8mer (Vallejo-Diez et al., 2013) (tabla 2).

Parece claro que la forma desaminada del péptido 8mer es capaz de activar una respuesta humoral en los pacientes con EC. Por eso uno de los objetivos de esta tesis fue determinar el efecto que tiene este péptido sobre las principales células implicadas en la respuesta adaptativa de la EC, las CD.

Prolaminas	Epítomos de células T	Péptidos
<b>γ-gliadina</b>	QQPQQPFPQ	QQP. <b>FPLQPQQP</b> .FPQPQQPQQPFPQ.X
<b>ω-gliadina</b>	QQPFPQQPQ QQPQQPFPQ	QQX. <b>FPLQPQQP</b> .FPQQPQQP QQX. <b>FPLQPQQP</b> .FPQQPQQPFPQ.X QLQQPFPQQPQQP. <b>FPLQPQQP</b> .FP
<b>ω-secalina</b>	QQPFPQQPQ PFPQQQPF	QQX. <b>FPLQPQQP</b> .FPQQPQ QQX. <b>FPLQPQQP</b> .SPQQPQLPFPQPQQPFFVVVV
<b>Hordeína</b>	QQPFPQQPQ PFPQQQPF	QQP. <b>FPLQPQQP</b> .FPQQPQQPFPQPQQPFR QQPFPQPQQP. <b>FPLQPQQP</b> .FP
<b>Glutenina</b>	QQPFPQQPQ QQPQQPFPQ	S. <b>FPLQPQQP</b> .FPQQPQQPFPQP QQPQQPFPQQPQQP. <b>FPLQPQQP</b> .FP

**Tabla 2: Identificación y análisis de los alineamientos de secuencia entre el péptido 8-mer y tres conocidos epítomos de gluten de células T.** En negrita se marca la secuencia del péptido 8-mer, y las secuencias de los epítomos de gluten de células T están subrayados. Tesis Sara Vallejo Diez (2013).

### 1.4B.1.3. Alteración de la red de citocinas en la enfermedad celíaca.

En la EC activa, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y los LIE CD8<sup>+</sup> desencadenan respuestas Th1 dominadas por IFN $\gamma$ , el factor de transcripción T bet, y citocinas pro-inflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-18, IL-21), junto al descenso de IL-10 y TGF $\beta$  (Forsberg et al., 2002; Leon et al., 2006; Nilsen et al., 1995), y la producción de IL-15 (Maiuri et al., 2003). Este perfil pro-inflamatorio, que desaparece en la fase de remisión, activa mecanismos efectores del daño tisular.

Al contrario de lo que ocurre en otras enfermedades inflamatorias crónicas del intestino, en la EC activa no aumenta la expresión de IL-12, principal citocina de la diferenciación Th1, por lo que debe haber otras citocinas que ejerzan esta función, como

## 1.- INTRODUCCIÓN

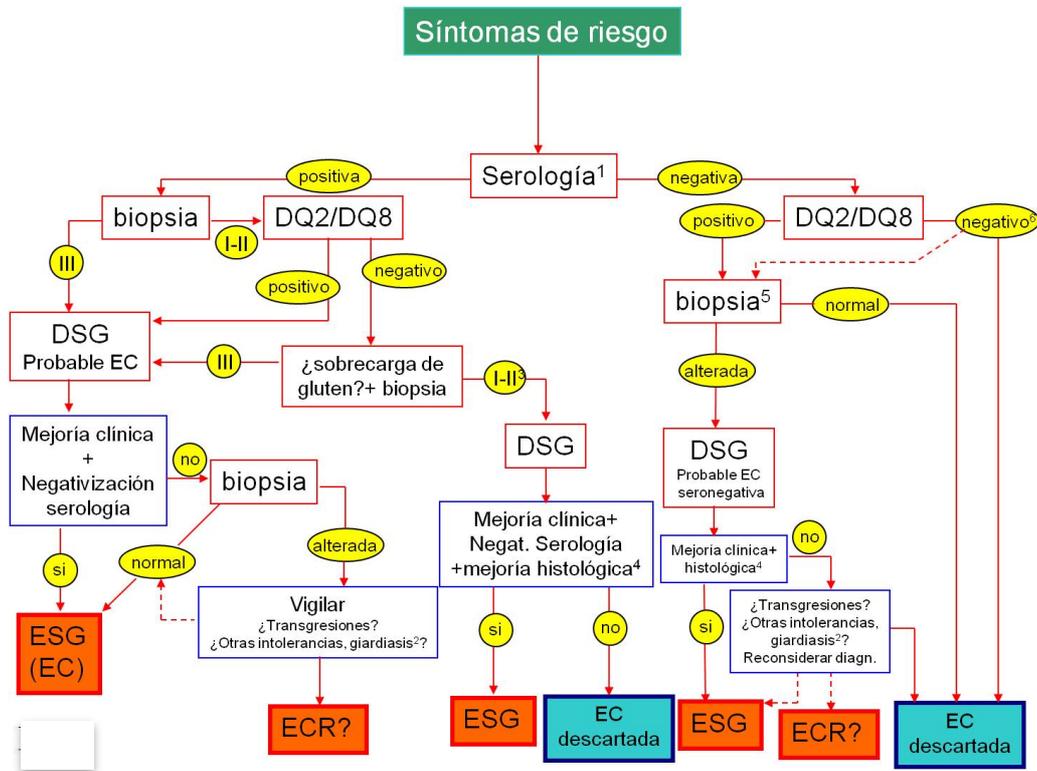
el IFN $\alpha$ , producido por CD (Di Sabatino et al., 2007; Monteleone et al., 2001), o la IL-21 (Fina et al., 2007; Garrote et al., 2008), cuyo gen ha sido localizado en una región ligada a la susceptibilidad de la EC (Sarra et al., 2013; van Heel et al., 2007). Las citocinas producidas por células de la inmunidad adaptativa (IFN $\gamma$ , IL-21), o innata (IFN $\alpha$ , IL-15), podrían determinar el desarrollo de la inflamación y la enteropatía (Garrote et al., 2008; Meresse et al., 2009), además de contribuir a la pérdida de tolerancia al gluten por bloqueo de la vía de señalización del TGF $\beta$ , por IL-15 (Benahmed et al., 2007), o por inhibición de la supresión de los linfocitos T efectores por linfocitos Treg, a través de la IL-21 (Meresse et al., 2009).

### **1.4B.2. La inmunología en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad celíaca.**

El diagnóstico de la EC se basa en tres pilares: 1) La determinación de alteraciones en la mucosa duodenal mediante el estudio anatomopatológico, 2) la susceptibilidad genética (HLA-DQ2/DQ8) y 3) la cuantificación de anticuerpos específicos en el suero de los pacientes (anticuerpos aTG2 y anti-Endomisio) (Abadie et al., 2011; Catassi and Fasano, 2010; Dieterich et al., 2000). Hasta hace poco, las recomendaciones para el diagnóstico de la EC (ESPGHAN 1990) se basaban en la realización, al menos, de una primera biopsia intestinal cuando el paciente tomaba gluten, siendo en algún caso necesario para confirmar definitivamente el diagnóstico la realización de una segunda o incluso una tercera biopsia y de una prueba de provocación con gluten (Ribes-Koninckx et al., 2012). En las nuevas recomendaciones (Husby et al., 2012) se establece que en algunos casos de niños sintomáticos y con unos datos analíticos concluyentes (anticuerpos anti-TG2 muy elevados junto con anticuerpos Anti-Endomisio positivos y HLA de riesgo) realizados en laboratorios expertos, el especialista podría establecer el diagnóstico de EC sin necesidad de biopsia (figura 4).

Sin embargo, la biopsia intestinal, además de los estudios de morfometría para confirmar o no la lesión, puede aportar información adicional de utilidad aún en ausencia de lesión atrófica (depósitos de IgA anti-TG2, recuentos de LIE por citometría, etc.) Hay que tener en cuenta que algunos de los síntomas de la EC en la infancia pueden deberse a otras patologías, y el diagnóstico de los adultos plantea otros problemas, en especial cuando los niveles de anticuerpos séricos son negativos. La sensibilidad de las pruebas serológicas es muy baja cuando la lesión intestinal es leve.

Los nuevos criterios tampoco tendrían en cuenta el efecto de la dieta sin gluten, que puede aportar información relevante en los casos dudosos. Finalmente, la presencia de marcadores genéticos de riesgo positivos, no quiere decir que el individuo vaya a desarrollar necesariamente la enfermedad (Husby et al., 2012).



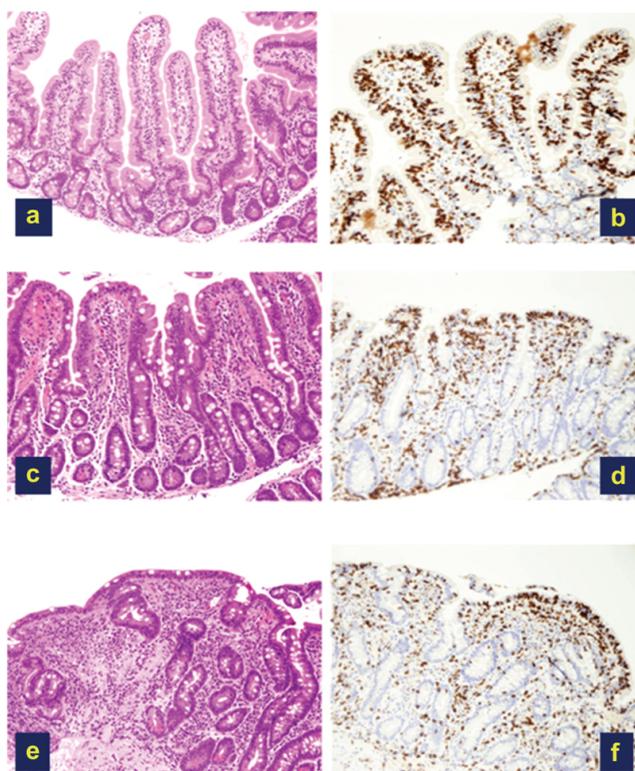
**Figura 4: Protocolo de uso de los marcadores de laboratorio en el diagnóstico de la Enfermedad Celíaca.** <sup>1</sup>Serología: anticuerpos anti-endomisio o anti-transglutaminasa IgA (ó IgG en déficit de IgA). <sup>2</sup>I, II, III: Grados de la clasificación de Marsh, alteración de la mucosa intestinal. DSG: Dieta Sin Gluten. EC: Enfermedad Celíaca. ESG: Enteropatía Sensible al Gluten. ECR: Enfermedad Celíaca Refractaria.

La atrofia de las vellosidades ha sido considerada durante muchos años como el cambio principal para hacer el diagnóstico de EC (Murray and Green, 1999; Trier, 1998). El reconocimiento posterior de alteraciones más leves, fue importante para entender las características histológicas de la enfermedad, especialmente el infiltrado inflamatorio del epitelio y de la LP (Marsh et al., 1990). Por estas razones, Marsh clasificó los patrones histológicos a partir del daño de la mucosa del intestino delgado (figura 5) (Marsh, 1989a). Es una clasificación corta y precisa de la lesión intestinal, tanto en el diagnóstico inicial como en el seguimiento. Permite comparar las distintas fases de la enfermedad en el mismo paciente.

## 1.- INTRODUCCIÓN

TIPO 0: mucosa normal. No hay signos de enfermedad. Histológicamente, se considera una mucosa normal cuando podemos observar al menos 4 vellosidades normales “en dedo de guante” seguidas en fila en el mismo corte histológico.

TIPO 1: lesión infiltrativa. Se caracteriza por una mucosa con arquitectura normal que presenta como único hallazgo significativo un incremento de LIE. Se observa en pacientes con EC que siguen una dieta sin gluten (DSG) e indica que están ingiriendo mínimas cantidades de gliadina o que el paciente aún no está en remisión completa. Más importancia tiene si se descubre en familiares de pacientes celíacos lo que indicaría una EC potencial (Marsh et al., 1990). Esta fase no es diagnóstica de la enfermedad.



**Figura 5: Diferentes grados de alteraciones en la mucosa duodenal de pacientes celíacos:** (A-B) Lesión Marsh 1: vellosidades normales e incremento de linfocitos intraepiteliales (LIE) (A, tinción de hematoxilina/eosina; B, marcaje con anti-CD3). (C-D) Lesión Marsh 3a: Atrofia vellositaria moderada y aumento de LIE (C, tinción de hematoxilina/eosina; D, marcaje con anti-CD3). (E-F) Lesión Marsh 3c: Atrofia vellositaria total e incremento de LIE (C, tinción de hematoxilina/eosina; D, marcaje con anti-CD3). Magnificación x20. (U. Volta and V. Villanacci. *Celiac disease: diagnostic criteria in progress. Cellular & Molecular Immunology* (2011) **8**, 96–102)

TIPO 2: lesión hiperplásica. Se caracteriza por una arquitectura vellositaria normal, con incremento de LIE y con hiperplasia críptica. Este tipo es muy raro de ver en biopsia y únicamente se ha observado en estudios experimentales (Marsh, 1989a) o en pacientes con dermatitis herpetiforme (Marsh, 1989b).

TIPO 3: lesión destructiva. Son lesiones diagnósticas de enfermedad celíaca. Aunque el incremento de LIE es un criterio obligado para este tipo de lesión, puede raramente verse un número normal de LIE, si el paciente acaba de comenzar la DSG. Puede dividirse en 3 subgrupos en base al grado de atrofia, modificación de Oberhuber: Tipo 3a: atrofia vellositaria leve; Tipo 3b: atrofia vellositaria marcada; y Tipo 3c: mucosa plana (atrofia vellositaria total).

Además de la EC, hay otros procesos en los que se puede observar una morfología similar a la EC temprana que presenta arquitectura vellositaria normal y aumento de LIE ( $> 5/20$  enterocitos), como la hipersensibilidad a algunos alimentos (entre los que destacan las proteínas de la leche, arroz, pollo, pescado, otros cereales, etc), la presencia de infecciones como las debidas a *Helicobacter pylori*, la giardiasis y la criptosporidiosis. La giardiasis produce además, un importante aumento de inflamación mononuclear a nivel de la LP, con presencia de folículos linfoides, que son relativamente escasos en la EC (Oberhuber et al., 1997; Weinstein et al., 1970).

Aunque la atrofia de las vellosidades ha sido considerada como una de las alteraciones más características para el diagnóstico de EC (Murray and Green, 1999), el patólogo debe tener en cuenta que existen también otras enfermedades con estas alteraciones para hacer el diagnóstico diferencial. Por ello es importante disponer de herramientas diagnósticas que complementen el diagnóstico anatomopatológico.

### **1.4B.3. Nuevas técnicas en el diagnóstico de la enfermedad celíaca: Inmunofenotipaje por citometría de flujo, el linfograma intraepitelial.**

Los cambios en las subpoblaciones de LIE son una característica constante en la mucosa duodenal de los pacientes con EC por lo que su caracterización mediante citometría de flujo es una herramienta diagnóstica de utilidad. Estas variaciones son las siguientes: 1) Aumento del porcentaje total de LIE (en relación al total de células del epitelio) que se observa durante las fases activas de la enfermedad, y se normaliza tras la exclusión del gluten de la dieta. 2) Reducción de la fracción de células CD3<sup>-</sup> respecto al total de LIE que llega a alcanzar valores prácticamente indetectables, normalmente  $<20\%$ , y que sufre también una recuperación tras la exclusión del gluten de la dieta (Eiras et al., 2000). 3) Aumento del número de células T $\gamma\delta^+$  respecto al total de LIE (Arranz et al., 1994; Spencer et al., 1991). Este aumento se considera casi

## 1.- INTRODUCCIÓN

patognomónico de la EC y permanece constante tras la retirada del gluten. El valor medio que suele alcanzar esta población se sitúa en torno al 25% (Leon et al., 2002). Este aumento se observa en todas las fases de la EC siendo permanente e intenso, a diferencia del aumento observado en otras enteropatías como intolerancia alimentaria, criptosporidiasis, giardiasis, o déficit de IgA (Spencer et al., 1991), donde el aumento es transitorio y moderado.

Las ventajas de la citometría de flujo como herramienta de diagnóstico en la EC son: 1) Complementa al estudio anatomopatológico convencional aumentando su especificidad, realizándose al mismo tiempo con una sola pieza endoscópica. 2) Las alteraciones observadas en las subpoblaciones de LIE parecen ser extensivas a las formas latentes de EC y a la forma de expresión cutánea de la sensibilidad al gluten (dermatitis herpetiforme), en las que tanto las alteraciones anatomopatológicas como los marcadores séricos son de aparición inconstante (Savilahti et al., 1997). 3) El aumento de células T $\gamma\delta$  permanece tras la exclusión del gluten, evitando realizar pruebas de provocación con gluten para confirmar el diagnóstico de EC. 4) La persistencia de un número elevado de LIE en la biopsia de control tras el tratamiento de exclusión ayuda en la detección de transgresiones dietéticas (Leon et al., 2004). Por todo ello, el estudio de las variaciones de los LIE por citometría de flujo resulta ser una herramienta potente y eficaz que complementa el diagnóstico de EC.

### 1.4B.4. Desarrollo de nuevas terapias en la enfermedad celíaca.

Hasta el momento, el único tratamiento efectivo y seguro de la EC es la dieta estricta sin gluten de por vida (DSG) (Rodrigo, 2009; Schuppan et al., 2009). Sin embargo, es conocido que el seguimiento de esta dieta no siempre es fácil, tiene un coste económico más elevado y, además, el gluten de trigo es un componente esencial de la alimentación y se utiliza frecuentemente como aditivo. Sea de forma voluntaria o involuntaria, la realización de transgresiones dietéticas pueden desencadenar la cronificación de la enfermedad y/o la aparición de complicaciones graves asociadas. Parece claro que la calidad de vida de estos pacientes podría mejorarse mediante el empleo de terapias alternativas o complementarias a la dieta, que protegieran de la toxicidad del gluten en aquellas situaciones en las que es difícil evitar la ingesta (Akobeng and Thomas, 2008). En este sentido, la producción de pan o alimentos similares a los que contienen cereales que no sean *tóxicos* para los pacientes será un

alivio para ellos, pero más importante sería aún disponer de una droga o fármaco que neutralizara al gluten tras ser ingerido, antes de llegar al intestino delgado.

Las estrategias alternativas a la DSG que se han propuesto hasta el momento pueden ser agrupadas en dos grandes áreas: unas son de tipo *cuantitativo*, se relacionan con la manipulación del agente desencadenante, y tienen como objetivo la eliminación de los péptidos *tóxicos* de la dieta, y otras son de tipo *cualitativo*, cuya pretensión es inhibir o mitigar los efectos inmuno-estimuladores de estos péptidos en el intestino del paciente. En el primer caso, hay dos formas principales de conseguir el objetivo: reduciendo la ingestión (como en la DSG) mediante el empleo de variantes de trigo u otros cereales que carecen o tienen menor contenido de péptidos *tóxicos* o secuencias inmunogénicas, o bien por detoxificación del gluten antes de su llegada al intestino delgado, lo que se consigue induciendo la proteólisis enzimática de los péptidos lesivos para el intestino. El desarrollo de estrategias *cualitativas* se basa en el conocimiento adquirido sobre los complejos mecanismos genéticos, moleculares y celulares que determinan la pérdida de tolerancia frente al gluten, y el objetivo sería el diseño de estrategias o protocolos capaces de inducir la inmunomodulación local y específica frente al gluten en la mucosa intestinal, mediante el bloqueo de la activación de los linfocitos T reactivos al gluten, o de los mediadores de la cascada inflamatoria.

Hasta la fecha se han realizado ensayos clínicos con 5 alternativas terapéuticas, potencialmente complementarias entre sí. El acetato de larazotido AT-1001, desarrollado por la compañía americana Alba Therapeutics, tiene como objetivo impedir el paso paracelular del gluten a la LP mediante reordenación y cierre de las uniones intercelulares densas (Paterson et al., 2007). Las endopeptidasas (ALV003 y AN-PEP) degradarían el gluten hasta conseguir fragmentos no tóxicos que, al alcanzar la LP, no desencadenarían una respuesta inmunitaria patológica (Lahdeaho et al., 2014; Pyle et al., 2005). Por otro lado, se están ensayando vacunas terapéuticas que intentan conseguir tolerancia al gluten (NexVax2) (Sollid and Khosla, 2011), además de los estudios basados en la infección con parásitos como el *Necator americanus* (Daveson et al., 2011), y la utilización de fármacos inmunomoduladores, como el inhibidor de los receptores CCR9 de los linfocitos T (CCX282-B, Traficet-EN) (Crespo Perez et al., 2012).

Es importante recordar que todas estas nuevas alternativas terapéuticas están en fase de investigación y, por el momento, se postulan como “complementos” para evitar

## 1.- INTRODUCCIÓN

---

el daño que contaminaciones o transgresiones dietéticas puedan provocar pero no son, en ningún caso, sustitutivas de la DSG por el momento.

Dado que la EC se caracteriza por una escasa mortalidad, aunque la morbilidad es elevada, y existe un tratamiento de probada eficacia, cualquier tratamiento alternativo solo podrá ser aceptado si demuestra ser seguro, eficaz y con un coste razonable. En este sentido, la falta de un modelo animal de EC, en el que poder evaluar todos estos parámetros podría retrasar de forma importante la implementación práctica de estas estrategias. Se ha propuesto que cualquier nuevo agente terapéutico debe ser capaz de inducir una buena tolerancia local (y sistémica) al gluten, no presentar antigenicidad ni efectos secundarios indeseados, y permitir la administración dirigida o la localización específica en el intestino (Sollid and Khosla, 2011).

### **1.4B.5. Nuevas inmunoterapias basadas en la glicosilación de los péptidos derivados de la gliadina implicados en la patología celíaca.**

La glicosilación es la modificación más común que sufren las proteínas, y otras moléculas como los lípidos, tras su síntesis celular. Se estima que más del 50% de todas las proteínas celulares, especialmente las proteínas unidas a membrana, están glicosiladas. La glicosilación está mediada por una serie de enzimas como son las glicosiltransferasas, que permiten el intercambio de un azúcar entre una molécula donadora y un determinado sustrato, y las glicosidasas, enzimas que catalizan la hidrólisis de las uniones glicosídicas en las estructuras glicídicas. Las moléculas resultantes se denominan glicanos. Los glicanos se definen como conjuntos de hidratos de carbono que incluyen monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, y sus conjugados (glicoproteínas, glicolípidos, y proteoglicanos). Los hidratos de carbono que se incorporan juegan un importante papel en la función de la molécula resultante debido a que participan en el plegamiento y conformación final, contribuyen a las propiedades estructurales, proporcionan carga hidrofílica, y median en las interacciones con otras moléculas. En particular, estas interacciones moleculares tienen especial relevancia en el sistema inmunitario (van Kooyk and Rabinovich, 2008): debido a que los glicanos están involucrados en la generación de antígenos, en los fenómenos de migración de las células inmunitarias (Peaper and Cresswell, 2008), en la señalización celular a través del TCR y del receptor de linfocitos B (Sperandio et al., 2009), en la generación y función de los anticuerpos (Rabinovich and Croci, 2012), en los mecanismos de

diferenciación celular (Crocker et al., 2007), desencadenando una respuesta inmunitaria cuando son reconocidos como agentes patógenos (Arnold et al., 2007) e interviniendo en los mecanismos de homeostasis cuando pertenecen a estructuras propias del organismo (Marth and Grewal, 2008).

Los glicanos son reconocidos por las células del sistema inmunitario a través de los receptores de lectinas de tipo C o CLR, que se encuentran en las CPA, sobre todo en las CD (Garcia-Vallejo and van Kooyk, 2009). Son RRP al igual que los TLR. Los TLRs son capaces de reconocer una gran variedad de antígenos y desencadenar las vías de señalización de una respuesta pro-inflamatoria, sin embargo no son capaces de internalizar el antígeno. Esta función está cubierta por los CLR que también son capaces de captar otras moléculas que pueden modular las cascadas de señalización iniciadas por los TLRs o por otros mecanismos. Los CLR se definen como receptores proteicos que se unen a determinados carbohidratos y reconocen de manera específica glicanos. Tras la unión del glicano al CLR, se produce la internalización del glicano y su presentación a los linfocitos T a través de las moléculas MHC de clase I o II. Esta presentación antigénica puede iniciar una respuesta inmunitaria de tipo Th1, Th2 o Th17, que depende en gran medida de si existe una señalización co-estimuladora mediada por los TLR. En la ausencia de cualquier señal de peligro, la interacción entre el glicano y el CLR suele llevar a la activación de los mecanismos de tolerancia y a la proliferación de linfocitos Treg (Janeway and Medzhitov, 2002; Kawai and Akira, 2008; van Vliet et al., 2007).

El receptor no-integrina que acapara la molécula de adhesión intercelular (ICAM)-3 específica de CD (DC-SIGN por sus siglas en inglés) es un CLR transmembranal de tipo II presente en las CD. La función principal de DC-SIGN es el reconocimiento de glicanos a través de su dominio de reconocimiento de carbohidratos (DRC) (Feinberg et al., 2001). Así, DC-SIGN reconoce glicanos fucosilados, tales como los antígenos de sangre de tipo Lewis ( $Le^a$ ,  $Le^b$ ,  $Le^x$ ,  $Le^y$ , y sulfo- $Le^a$ ) y estructuras con alto contenido en manosa (van Liempt et al., 2006), por lo que DC-SIGN es capaz de reconocer una amplia variedad de ligandos derivados de patógenos (por ejemplo, por VIH, virus del Ébola, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans*, *Schistosoma mansoni*, y *Helicobacter pylori* (Appelmelk et al., 2003) y ligandos propios, como la molécula de adhesión intercelular (ICAM)-2, e ICAM-3, receptor de macrófagos 1 (Mac-1), butirofilina y la porción Fc de las inmunoglobulinas (Anthony et al., 2008; Garcia-Vallejo and van Kooyk, 2009). DC-SIGN se expresa fundamentalmente en las

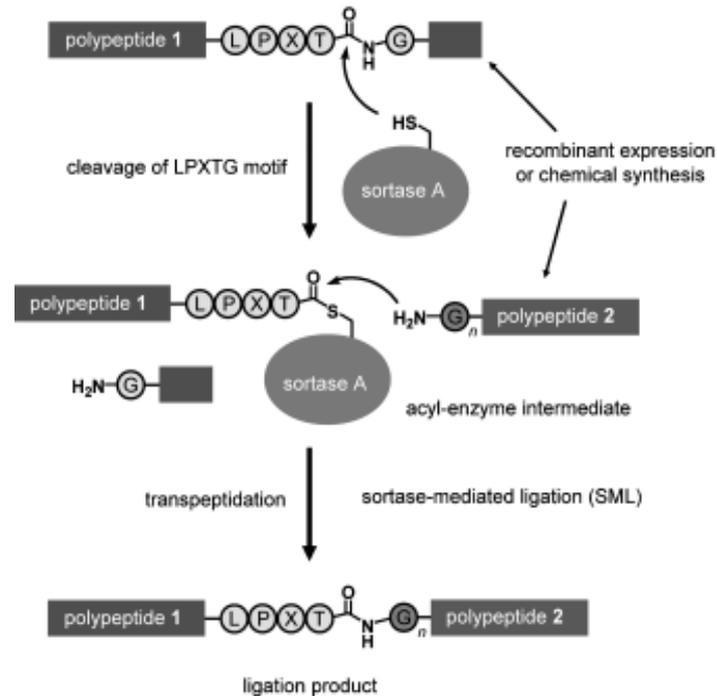
## 1.- INTRODUCCIÓN

---

CDi de la mucosa y de la dermis, donde las CD son las principales células encargadas de la captación antigénica. Tras la captación, y mediante endo-lisosomas, el antígeno se presenta a las células T mediante moléculas MHC-II, dando lugar a una respuesta pro-inflamatoria o tolerogénica dependiendo de la naturaleza del antígeno, y de si existe co-estimulación a través de los TLR (García-Vallejo and van Kooyk, 2009).

Las CD son uno de los principales componentes de la respuesta inmunitaria en la EC, y la señalización a través de DC-SIGN podría tener un efecto directo en la modulación de la respuesta frente al gluten. Por ello, parte de nuestro trabajo se ha centrado en la glicosilación del péptido 33mer de la  $\alpha$ -gliadina, principal péptido implicado en la respuesta adaptativa en la EC, para tratar de modular la inflamación producida por el péptido nativo, y estudiar sus posibles aplicaciones terapéuticas en la EC. Para ello se deberán de sintetizar glicanos que contengan el péptido 33mer en su forma desaminada y alguno de los ligandos propios de DC-SIGN, o lo que es lo mismo, glicosilar el 33mer desaminado.

Se han descrito varias técnicas para la glicosilación peptídica, pero últimamente destaca una técnica sobre las otras debido a las ventajas que ofrece: la reacción de la Sortasa A. La *Staphylococcus aureus* sortasa A es una enzima transpeptidasa de origen bacteriano presente en la membrana plasmática de bacterias Gram+, en este caso en la membrana del *Staphylococcus aureus*. Su función principal es la incorporación de proteínas, importantes en la fisiología y en la patogenia, a la pared celular bacteriana (Popp et al., 2007; Proft, 2010; Tsukiji and Nagamune, 2009). La Sortasa A reconoce una corta secuencia peptídica LPXTG dentro del polipéptido 1 y se une al enlace amida entre la treonina (T) y la glicina (G) con un sitio activo cisteína (Cys184), generando una acil-enzima covalente intermedia. El grupo tioéster intermedio es entonces atacado por el grupo amino de la oligo-glicina del polipeptido 2, el cual permite la unión de los dos péptidos por una unión peptídica sólida y natural. La enzima intermedia es entonces degradada por moléculas de agua (Bolscher et al., 2011) (figura 6). Gracias a esta reacción, se pueden formar glicocompuestos formados por el péptido 33mer desaminado y carbohidratos que actuarían como ligandos endógenos de DC-SIGN, con el fin de modular la respuesta inmunitaria pro-inflamatoria que produciría el péptido 33mer desaminado nativo por sí solo.



**Figura 6. Reacción de la sortasa A.** La Sortasa A reconoce la secuencia LPXTG dentro del polipéptido 1 y se une al enlace amida entre la treonina (T) y la glicina (G), generando una acil-enzima covalente intermedia. El grupo tioéster intermedio es entonces atacado por el grupo amino de la oligo-glicina del polipeptido 2, el cual permite la unión de los dos péptidos por una unión peptídica (Obtenido de: *Tsukiji, S. and Nagamune, T. (2009), Sortase-Mediated Ligation: A Gift from Gram-Positive Bacteria to Protein Engineering. ChemBioChem, 10: 787–798*).

Trabajos anteriores han demostrado que la preparación de ligandos glicoconjugados en sistemas multivalentes aumenta la afinidad por el receptor DC-SIGN (Berzi et al., 2012; Luczkowiak et al., 2011; Sattin et al., 2010). Uno de estos tipos de plataforma polivalente son los dendrímeros Poli-AmidoAminados o dendrímeros PAMAM. Los dendrímeros PAMAM son estructuras esféricas altamente ramificadas, en cuyos extremos terminales se hayan grupos funcionales en forma activada que se unirán a los glicocompuestos que se hayan sintetizado previamente. Esta unión se realiza mediante reacciones químicas simples (Biricova and Laznickova, 2009). Las ventajas de este sistema son la permisibilidad de orientar geoméricamente los glicanos utilizados y el diseño de dendrímeros con la cantidad deseada de antígeno. Además son estructuras flexibles y solubles (Garcia-Vallejo et al., 2013). Todas estas características hacen que los dendrímeros sean las estructuras de elección para el uso de glicoconjugados del péptido 33mer para la modulación de la respuesta inmunitaria en la EC.

## 1.- INTRODUCCIÓN

---

## **2.- JUSTIFICACIÓN**

---

## 2.- JUSTIFICACIÓN

---

Como se ha comentado en la introducción, las principales poblaciones celulares del sistema inmunitario encargadas de modular los mecanismos de homeostasis y la respuesta inflamatoria en la mucosa intestinal son los LIE y las CD. Por ello, en esta tesis nos hemos planteado como primer objetivo el estudio fenotípico de las poblaciones de LIE en los diferentes tramos del intestino en individuos sanos, además de valorar si estas poblaciones sufren alteraciones en su distribución en las principales patologías inflamatorias que afectan a este órgano. En segundo lugar, nos hemos centrado en el estudio del efecto inmunogénico de los péptidos derivados de la gliadina 19mer y 33mer y, sobre todo, de un péptido de 8 aminoácidos identificado por primera vez en nuestro laboratorio, en un modelo *in vitro* de CD. Además, hemos analizado si la modificación del principal péptido inmunodominante 33mer, mediante la conjugación del mismo con carbohidratos capaces de interactuar con el receptor DC-SIGN, podría ser una vía para el desarrollo de inmunoterapias en el tratamiento de la EC.

Los LIE son una población heterogénea compuesta sobre todo por células  $T\alpha\beta$ ,  $T\gamma\delta$ , células NK y células NKT, que se encuentran intercalados entre los enterocitos. Estas células efectoras son la primera barrera defensiva en un órgano con una gran carga antigénica y protegen la integridad de la barrera mucosa. Sin embargo, aún no conocemos bien las poblaciones que incluyen y como se distribuyen a lo largo de los diferentes tramos del intestino. Además, se han descrito alteraciones en estas poblaciones como consecuencia de determinadas patologías inflamatorias, como es la EC. Es por esto que nos hemos planteado establecer los valores normales para cada una de las poblaciones de LIE a lo largo del intestino, y si la distribución de estas poblaciones varía en las principales patologías inflamatorias, como son la EC, la ECr y la CU. Para ello hemos utilizado la citometría de flujo. Esta técnica nos permite identificar y cuantificar una gran cantidad de células en una misma muestra de forma rápida y fiable, además de poder realizarse de forma simultánea con el estudio anatomopatológico utilizando un único explante de tejido obtenido en el mismo procedimiento endoscópico. Por todo ello, la estandarización del uso de la citometría de flujo para el análisis de la distribución de las poblaciones de LIE en la mucosa intestinal puede ser un buen método para caracterizar a estos pacientes, de utilidad como herramienta de apoyo al diagnóstico de confirmación y diferencial de estas patologías en la práctica clínica.

## 2.- JUSTIFICACIÓN

---

En la EC se han descrito diversos péptidos de la gliadina capaces de desencadenar una respuesta adaptativa, como es el 33mer, o de presentar un efecto tóxico directo sobre el epitelio, como el 19mer. En este contexto, nuestro grupo identificó en el plasma de pacientes celíacos, anticuerpos IgA específicos frente a la forma desaminada de un nuevo péptido de 8 aminoácidos (8mer: FPLQPQQP, 8mer desaminado: FPLQPEQP), identificado por primera vez en nuestro laboratorio como un producto específico de la degradación diferencial del gluten por proteasas del intestino celíaco. Por todo ello nos propusimos investigar el posible efecto inmunogénico del péptido 8mer, en comparación con los péptidos 33mer y 19mer. Para ello utilizamos un modelo de cultivo *in vitro* de CD obtenidas de sangre periférica de pacientes celíacos (tanto en actividad como en DSG) que presentaban la molécula de restricción HLA-DQ2+ y voluntarios sanos no-HLA-DQ2+, donde se estudió marcadores de maduración/activación y los niveles de expresión de ARNm de varias citocinas implicadas en las respuestas Th1, Th2 y Th17. Por último, se analizó la capacidad de estas CD cultivadas con los péptidos para inducir la proliferación de linfocitos T aislados de la sangre periférica del mismo paciente.

En los últimos años ha crecido exponencialmente el interés por el desarrollo de inmunoterapias dirigidas a las CD para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y del cáncer. Entre ellas destaca la utilización de glicanos como vehículo para el antígeno utilizado. Esto es debido a que estas moléculas muestran una baja toxicidad e inmunogeneicidad, se pueden producir a gran escala y son los ligandos naturales de los CLR, principalmente DC-SIGN, presentes en las CD. DC-SIGN está implicado en fenómenos que condicionan el fenotipo y la actividad final de las CD, y el reconocimiento de ligandos endógenos a través de este receptor conlleva el desencadenamiento de los mecanismos de homeostasis. Debido a esto, parte de nuestro trabajo se ha centrado en la glicosilación del péptido inmunodominante p57-89 de la  $\alpha$ -gliadina (33mer), para tratar de modular la respuesta pro-inflamatoria producida por el péptido nativo. Se estudió primero la expresión de DC-SIGN en el duodeno de los pacientes celíacos mediante inmunofluorescencia. Al comprobar que se trataba de una buena diana terapéutica, decidimos utilizar carbohidratos reconocidos como endógenos por este receptor para la glicosilación del péptido 33mer. La técnica utilizada para la glicosilación fue la reacción de la sortasa A, debido a que es una reacción que se produce de manera natural sin dejar residuos. Además, los glicanos obtenidos se unieron a moléculas dendriméricas debido a que éstas presentan una serie de ventajas

como su flexibilidad y solubilidad, además de la posibilidad de orientar geoméricamente a los glicanos y de controlar la cantidad de antígeno que llega a la CD. La producción de estos glicanos dendriméricos del 33mer nos llevó a analizar el posible efecto modulador de estas moléculas sobre las CD, como un primer paso en el desarrollo de una inmunoterapia para la EC.

## 2.- JUSTIFICACIÓN

---

## **3.- OBJETIVOS**

---

### **3.- OBJETIVOS**

---

1.- Estudiar posibles diferencias cuantitativas en los linfocitos del compartimento intraepitelial entre la mucosa del duodeno y del íleon, así como entre el colon proximal y distal, de individuos sanos.

1a.- Analizar si estas posibles variaciones se deben a diferencias cuantitativas en la expresión de los ligandos de los marcadores de migración selectiva de la mucosa intestinal.

2.- Validar la determinación por citometría de flujo de las variaciones de los linfocitos intraepiteliales en la mucosa duodenal de pacientes con enfermedad celíaca, como método de apoyo al diagnóstico de esta enfermedad en la práctica clínica.

3.- Evaluar posibles cambios en la población de células T *natural killer* invariantes (iNKT) en el compartimento intraepitelial del duodeno de pacientes con enfermedad celíaca.

4.- Explorar si existen variaciones cuantitativas en la población de linfocitos intraepiteliales de la mucosa afectada por enfermedad de Crohn o por colitis ulcerosa, y su posible utilidad en el diagnóstico diferencial entre ambas entidades y con otras patologías inflamatorias gastrointestinales.

5.- Investigar los efectos inmunogénicos de un nuevo péptido de gliadina de 8 aminoácidos (8mer), utilizando un modelo *in vitro* de células dendríticas obtenidas de sangre periférica y un ensayo linfoproliferativo autólogo.

6.- Estudiar la posible modulación de la respuesta inmunitaria frente al gluten mediante la glicosilación del péptido inmunodominante p57-89 de la  $\alpha$ -gliadina (33mer) y la interacción de este glicocompuesto con células dendríticas que expresan el receptor DC-SIGN.

6a.- Analizar mediante inmunofluorescencia la expresión de este receptor en las células de la mucosa duodenal de pacientes celíacos y de individuos sanos.

### **3.- OBJETIVOS**

---

## **4.- MATERIAL Y MÉTODOS**

## 4.- MATERIAL Y MÉTODOS

---

### 4.1. Pacientes y obtención de muestras biológicas

En el desarrollo experimental de esta tesis doctoral se han utilizado muestras biológicas humanas tomadas siguiendo los protocolos para intervenciones programadas con fines de diagnóstico y/o de seguimiento de las patologías estudiadas (EC, CU y ECr). En algunos casos se utilizaron voluntarios sanos como controles.

Para el estudio de las variaciones de las subpoblaciones de LIE a lo largo del intestino en pacientes sanos se utilizaron biopsias de duodeno, íleon y colon obtenidas en los procedimientos programados con fines diagnósticos donde se descartó cualquier tipo de patología intestinal, incluyendo EC (C-NoEC) y EII (C-NoEII), en el Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (Dr. Fernández Salazar). Ninguno de ellos presentaba patología autoinmune o sistémica en el momento del diagnóstico. Los pacientes incluidos en el estudio de las diferencias entre el íleon y el duodeno fueron 12 No-EC y 12 No-EII, de los que se obtuvo una biopsia intestinal por paciente (duodeno, n=12; íleon, n=12). Todos los pacientes incluidos son adultos (rango de edad: 19-78 años, media de edad: 39, 58.9% varones). En el estudio de las diferencias entre el colon proximal y el colon distal de pacientes sanos se utilizaron biopsias, obtenidas mediante colonoscopia, de 12 pacientes sanos adultos (rango de edad: 28-62 años, media de edad: 42.5, 62.4% varones). De cada uno de los pacientes se obtuvieron dos explantes del colon proximal y otros dos de colon distal (en cada caso, uno para citometría y otro para análisis molecular).

Para los estudios en EC, se utilizaron muestras provenientes de cuatro tipos de individuos: individuos control no celíacos sin inflamación duodenal (C-NoEC), pacientes celíacos en actividad (aEC), pacientes celíacos tratados en dieta sin gluten (DSG-EC), y pacientes control que presentaban algún tipo de inflamación duodenal no asociada a la EC (EGI-NoEC). Al diagnóstico, todos los pacientes celíacos en actividad presentaban síntomas compatibles con la enfermedad, además de serología (anticuerpos IgA anti-endomisio y/o aTG2), genética positiva (HLA-DQ2/DQ8) y alteraciones histológicas en la mucosa de la biopsia duodenal. Por el contrario, los pacientes en DSG presentaban una recuperación de la lesión histológica (Marsh 0-1), y serología negativa desde al menos un año. Los grupos control, C-NoEC y EGI-No-EC, incluyeron pacientes remitidos a la consulta de gastroenterología por sospecha clínica de alguna enfermedad intestinal. En todos los casos, se descartó la EC y otras enfermedades autoinmunes (serología y marcadores genéticos de riesgo negativos). Los pacientes que

#### 4.- MATERIAL Y MÉTODOS

presentaban inflamación duodenal debido a otros procesos patológicos (diarrea crónica, gastritis por *Helicobacter pylori*, hernia de hiato, etc.) fueron incluidos en el grupo de pacientes EGI-NoEC. Los que no presentaban ningún tipo de afectación duodenal se incluyeron en el grupo de C-NoEC. Se obtuvieron 2 tipos de muestras biológicas: sangre periférica y explantes de mucosa duodenal obtenidos por biopsia. Las muestras de sangre periférica fueron obtenidas en el Centro Médico de la Universidad Libre de Ámsterdam, Holanda (VU University Medical Center), en el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid (Dr. Garrote), y en los servicios de Aparato Digestivo y Gastroenterología pediátrica del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (Dr. Fernández-Salazar y Dra. Calvo). Las biopsias de mucosa duodenal se obtuvieron mediante cápsula de Watson (Ferias Medical Lt, Uk) en duodeno distal o yeyuno en niños, o con pinzas de biopsia durante una gastroduodenoscopia (duodeno proximal o distal) en adultos, en los Servicios de Aparato Digestivo y Gastroenterología pediátrica del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (Dr. Fernández-Salazar y Dra. Calvo), Servicio de Gastroenterología del Centro Médico de la Universidad Libre de Ámsterdam, Holanda y biobanco del Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune (LISIN) de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina (Dr. Chirido).

Para el estudio de las variaciones de los LIE en la mucosa duodenal afectada por EC se incluyó un total de 60 individuos (rango de edad: 4-71 años, media de edad: 29.43, 37.8% varones) distribuidos en 15 pacientes en el grupo aEC, 15 en el grupo DSG-EC, 15 pacientes en el grupo EGI-NoEC y 15 en el grupo C-NoEC.

Para el estudio de la población de células iNKT intraepiteliales en la mucosa duodenal y sus alteraciones en la EC, se recogieron biopsias duodenales de 2 poblaciones independientes, en España y Argentina. La población española incluyó 25 pacientes aEC (edad media: 28.9 años; rango 5-76 años; 42% varones), 15 pacientes celíacos en DSG (DSG-EC; edad media: 34.2 años; rango 4-71 años; 34% varones), 15 pacientes con alguna otra patología duodenal diferente de EC (EGI-NoEC, edad media 42.1 años; rango 15-78 años; 56% varones) y 25 pacientes control que no presentaron ninguna patología gastrointestinal que afectara al duodeno (C-NoEC; edad media 38.3 años; rango 6-81 años; 30% varones). La población argentina incluyó 20 pacientes aEC (edad media 24.8 años; rango 4-56 años; 28% varones) y 19 C-NoEC (edad media 31.4 años; rango 6-62 años; 52% varones).

Para el estudio del efecto inmunogénico de la forma desaminada del péptido 8mer derivado de la gliadina, se utilizaron CD y linfocitos T obtenidos a partir de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de un total de 24 individuos (rango de edad: 18-56 años, media de edad: 28 años, 82% varones): 8 voluntarios sanos en los que se habían descartado enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, alergias, u otro tipo de patología sistémica (C-NoEC, n=8), 8 pacientes celíacos en DSG (DSG-EC, n=8) y 8 pacientes celíacos en actividad (aEC, n=8).

Para el estudio del receptor DC-SIGN en la mucosa duodenal se utilizaron cortes histológicos provenientes de 15 pacientes (rango de edad: 11-58 años, media de edad: 18 años, 65.5% varones): pacientes C-NoEC (n=5), pacientes DSG-EC (n=5) y pacientes aEC (n=5). Para los ensayos de captación de glicocompuestos derivados del péptido 33mer desaminado se utilizó sangre proveniente de dos donantes diferentes no celíacos y para los experimentos de linfoproliferación heteróloga con estos mismos compuestos se utilizaron muestras de sangre proveniente de 3 pacientes celíacos HLA-DQ2+.

En los estudios correspondientes a EII se utilizaron muestras de cuatro grupos de individuos (rango de edad: 26-87 años, media de edad: 54.20, 54.74% varones): pacientes control sin EII (C-NoEII), pacientes con CU activa (aCU), pacientes con ECr activa (aECr), pacientes control que presentaban algún tipo de inflamación mucosa en los que se descartó la EII (EGI-NoEII). Se utilizaron biopsias intestinales obtenidas mediante endoscopia exploratoria baja (colon e íleon terminal). Los pacientes con EII activa presentaban sintomatología compatible con EII en el momento del diagnóstico (diarrea, rectorragia, dolor abdominal) y se confirmó el diagnóstico mediante el estudio anatomopatológico de las lesiones de la mucosa intestinal. En el caso de los pacientes aCU se utilizaron biopsias de colon afectadas por la enfermedad (aCU-colon, n=30). Para el estudio de los pacientes con aECr se obtuvieron biopsias de colon afectadas con ECr (aECr-colon, n=30), biopsias de íleon con lesión característica de ECr (aECr-íleon, n=15), y biopsias de íleon sin afectación por ECr en pacientes con aECr colónica (NoaECr-íleon, n=15). Los pacientes en los que se descartó EII (EGI-NoEII) pero presentaban algún tipo de inflamación intestinal en el colon o en el íleon, fueron diagnosticados de colitis/ileitis infecciosa o medicamentosa, pólipos intestinales o síndrome del intestino irritable. En estos pacientes se recogieron muestras de íleon (EGI-íleon, n=14) o de colon (EGI-colon, n=34) según la zona intestinal afectada. Las muestras control (C-íleon, n=12 y C-colon, n=28) se obtuvieron durante la exploración

#### 4.- MATERIAL Y MÉTODOS

endoscópica de pacientes que acudieron a la consulta para descartar posibles patologías intestinales. Para el estudio de las alteraciones de la población de células NK-like en el colon proximal y distal de pacientes afectados por ECr, se utilizaron biopsias de colon provenientes de pacientes con ECr activa (n=11, rango de edad: 39-65, media de edad: 51, 38.5% varones), con diagnóstico de afectación mucosa mediante estudio anatomopatológico. A cada paciente se le extrajo un explante de colon proximal y otro explante de colon distal, ambos con afectación mucosa por aECr. Todas las muestras fueron tomadas en el Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (Dres. Fernández Salazar y Velayos).

Finalmente, se realizó una recogida protocolizada, anónima y codificada, de los datos del paciente, demográficos, clínicos y biológicos, histopatológicos, y de tratamiento (si lo hubiera). En todos los casos se obtuvo consentimiento informado de los pacientes a la toma de la muestra. Los protocolos de estudio fueron aprobados por la Comisión de Ética de los diferentes hospitales y servicios médicos incluidos en los diferentes abordajes experimentales y de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid para todos ellos.

#### **4.2. Aislamiento de linfocitos intraepiteliales y de leucocitos de lamina propia mucosa a partir de biopsia intestinal.**

Los explantes intestinales obtenidos mediante técnica endoscópica se conservaron en suero fisiológico y se comenzaron a procesar antes del transcurso de 2h. Una vez retirado el suero fisiológico, las biopsias se introdujeron en medio de cultivo RPMI 1640 (GibcoBRL Life Technologies, Austria) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, L-Glutamina al 1%, Penicilina/Estreptomicina al 1% y Gentamicina al 0,1% (medio de cultivo completo, MC) (todos de GibcoBRL Life Technologies, Austria), donde se añadió ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, *ethylenediaminetetraacetic acid*) a 1mM y dithiothreitol (DTT) a 1mM (ambos de Sigma/Aldrich, EEUU). Se realizó una incubación en agitación moderada a 37°C, tras la cual se recogió el sobrenadante sin la LP (que será procesada después). El sobrenadante se centrifugó durante 10 minutos (8000 rpm, temperatura ambiente (TA), con freno) y se recogió el pellet que contenía los LIE para ser resuspendidos en FACS Buffer (PBS, tampón salino fosfato [*phosphate buffered saline*, Lonza, Braine-l'Alleud, Bélgica] + 10% SFB) para su posterior análisis por citometría de flujo.

Los restos de biopsia (tejido duodenal sin células epiteliales ni LIE) fueron procesados para la obtención de leucocitos de la LP (LLP). El tejido se incubó en un agitador orbital a 37°C en presencia de 1mg/ml de Colagenasa D (Sigma/Aldrich, EEUU) en medio de cultivo RPMI, en ausencia de SFB, durante 90-120 minutos hasta que las biopsias fueron totalmente degradadas. El conjunto celular se filtró (70µm Filtro, BD Biosciences, EEUU) para eliminar fibras de tejido no celulares. Se resuspendieron las células en FACS buffer y se realizaron 2 lavados (1500 rpm, 5min, TA, con freno). Después se resuspendió el pellet en FACS buffer para su posterior análisis por citometría de flujo.

### 4.3. Cultivo de explantes de biopsia intestinal.

Para estudiar si la gliadina es capaz de producir cambios en la expresión de ARNm de  $V\alpha 24$  (molécula representativa de células iNKT) e  $IFN\gamma$ , se cultivaron biopsias duodenales provenientes de pacientes celíacos en DSG. Para ello se introdujeron las biopsias en medio de cultivo RPMI 1640 (GibcoBRL Life Technologies, Austria) suplementado con SFB al 10%, L-Glutamina al 1%, Penicilina/Estreptomicina al 1% y Gentamicina al 0,1% (MC) (todos de GibcoBRL Life Technologies, Austria) con o sin una solución de gliadina (Sigma-Aldrich, EEUU) a concentración 100µg/ml, y se cultivaron durante 3h a 37°C y 5% de  $CO_2$ . Trascorridas las 3h, se lavaron las biopsias en una solución balanceada de Hank (HBSS, *Hank's balanced salt solution*) con Gentamicina (500mg/ml, GibcoBRL Life Technologies, Austria) para evitar contaminaciones y transferidas a un nuevo medio de cultivo basal sin suplementar durante 21h, haciendo un total de 24h de cultivo, simulando el tránsito intestinal normal, en el que los antígenos alimenticios están en contacto con la mucosa duodenal 3h aproximadamente. Posteriormente, las biopsias fueron preservadas en RNAlater® (Ambion Inc, EEUU) para su análisis molecular.

### 4.4. Aislamiento y purificación de células mononucleares 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 CMSP. La purificación de CMSP se realizó mediante el procedimiento de centrifugación en gradiente de densidad o técnica del Ficoll, diluyéndose el volumen de sangre fresca 1:1 en MC. En un tubo aparte, se añadió un volumen de Ficoll (GE Healthcare BioSciences,

#### 4.- MATERIAL Y MÉTODOS

Reino Unido) igual al volumen de sangre original. Sin distorsionar nunca la fase, se añadieron los 2 volúmenes de sangre-MC sobre el volumen de Ficoll. Se centrifugó ( $t=30'$ ,  $T=20^{\circ}\text{C}$ , 2000 rpm, sin freno). Tras la centrifugación se recuperó cuidadosamente el halo de CMSP en la interfase Ficoll-medio de cultivo/suero. Esto se pasa a un tubo nuevo, lavándose en MC mediante centrifugación ( $t=10'$ ,  $T=20^{\circ}\text{C}$ , 1600 rpm, sin freno) para ayudar a preservar las proteínas de membrana. Se volvió a centrifugar ( $t=5'$ ,  $T=20^{\circ}\text{C}$ , 1500 rpm, con freno) y se decanta el sobrenadante. Se resuspendieron las células en MC y se determinó el número de CMSP obtenidos por paciente, utilizando una cámara de Neubauer con microscopio invertido, agregando 1:2 volumen de azul de Trypan (Sigma/Aldrich, EEUU, 2mg/ml en PBS) para determinar la viabilidad celular. Al finalizar, se resuspendieron en el volumen adecuado de MC.

#### 4.5. Obtención de células dendríticas a partir de células mononucleares de sangre periférica y derivadas de monocitos.

Para los ensayos del efecto del péptido 8mer desaminado sobre células dendríticas, se incubaron CMSP obtenidas mediante la técnica del Ficoll en un Flask de 25 cm<sup>3</sup> (Flask, frascos plásticos de cultivo registrados por Becton Dickinson, EEUU) durante 18h ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). Tras la incubación de las CMSP agitamos moderadamente el Flask y se recogieron las células que no se adhirieron al plástico. Se pasaron todas las células no adherentes resuspendidas en un total de 5ml de MC a un tubo de 15ml. Se preparó en otro tubo 3ml de Percoll/Nycoprep (Progen Biotechnik GmGH, Alemania) y se añadieron con cuidado sobre el Percoll 5ml de las CMSP resuspendidas. Se centrifugó ( $t=15'$ ,  $T=20^{\circ}\text{C}$ , 1500 rpm, sin freno) y se recuperó cuidadosamente el halo de células de baja densidad en la interfase Percoll-medio de cultivo/suero. Entre el 98% y el 100% de las células recuperadas presentan un fenotipo HLA-DR<sup>+</sup> con características morfológicas de CD (tanto al microscopio óptico como en microscopía electrónica de barrido) y son potentes estimuladores de linfocitos T *virgenes* aunque entre ellas también se encuentran monocitos. Estas células se pasaron a un tubo nuevo, lavándose en MC mediante centrifugación ( $t=5'$ ,  $T=20^{\circ}\text{C}$ , 1700 rpm, sin freno) para ayudar a preservar las proteínas de membrana. Se volvieron a centrifugar ( $t=5'$ ,  $T=20^{\circ}\text{C}$ , 1700 rpm, con freno) y se decantó el sobrenadante. Se resuspendieron las células en MC y se determinó el número de CD obtenidos por paciente, utilizando una cámara de Neubauer con microscopio invertido agregando 1:2 volumen de azul de Trypan

(Sigma/Aldrich, EEUU, 2mg/ml en PBS) para determinar además la viabilidad celular. Tras el conteo se resuspendieron en MC.

Para los ensayos de modulación de la respuesta inmunitaria mediada por células dendríticas mediante la glicosilación del 33mer desaminado, se utilizaron CD inmaduras (CDi) diferenciadas a partir de monocitos de sangre periférica de individuos sanos obtenidos mediante las técnicas descritas anteriormente (Ficoll y Percoll). Una vez obtenida la fracción enriquecida de CD y monocitos (los monocitos constituyen el 10% de las CMSP) se añadió nuevo MC suplementado con citocinas: factor estimulador de colonias de monocitos y macrófagos (GM-CSF, *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) (Santa Cruz, EEUU) e IL-4 (R&D, Reino Unido) a una concentración de 50ng/ml y 5ng/ml respectivamente. Las células se cultivan durante 6 días a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. A los 2 días se hace un lavado suave para eliminar las células sueltas y se cambia el medio de cultivo por MC nuevo suplementado con GM-CSF e IL-4. Al terminar el periodo de diferenciación se realizan 2 lavados con MC (t=5', T=4°C, 1500 rpm, con freno). Comprobaremos que los monocitos (CD14<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup>) se han diferenciado a células dendríticas mediante citometría (CD14<sup>-</sup>, CD11c<sup>+</sup>) y resuspendemos las CDi en MC dejándolas preparadas para los posteriores ensayos.

### 4.6. Preparación de péptidos derivados de la gliadina y glicosilación del péptido 33mer desaminado.

Los péptidos derivados de la gliadina (no recombinantes) utilizados en los estudios del efecto inmunogénico del péptido 8mer desaminado, se sintetizaron químicamente en la empresa Biomedal (Sevilla, España) con una pureza del 99.9%: estos fueron los péptidos 8mer desaminado (d8mer, FPLQPEQP), 19-mer (LGQQQPFPPQQPYQPQPF) y 33mer desaminado (d33mer, LQLQPFQPELPYPQPELPYPQPELPYPQPF). Como control de que la inmunogenicidad provocada por el péptido d8mer no fuera un artefacto se utilizó un péptido de 8mer modificado, en el que el aminoácido ácido glutámico (E) ha sido sustituido por histidina (H) (c8mer, FPLQPHQP). Todos los reagentes, incluidos los péptidos sintéticos, fueron chequeados para evitar contaminaciones por lipopolisacáridos (LPS) (PYROGENT® Plus, Cambrex Iberia Products, España) (Límite de detección 0.06 EU/ml).

#### 4.- MATERIAL Y MÉTODOS

Para los ensayos de modulación de la respuesta inmunitaria en la EC se produjeron glicopéptidos a partir del péptido 33mer desaminado (Biomedal, España) mediante la reacción de la Sortasa A. Para ello utilizamos glúcidos aislados y purificados en el laboratorio del Department of Molecular Cell Biology and Immunology, VU University Medical Center, Ámsterdam, Holanda (Lewis A, B, X [LeA, LeB, LeX], Maltohexosa (Stromholm et al.), SLN302 [Sia3], SLN306 [Sia 6], L404 (Kim et al.), G283 [Tn]) a los que se les sumó la secuencia peptídica de unión de la sortasa (KLPETG). El péptido 2 está formado por el péptido 33mer desaminado al que se le añaden 2 secuencias terminales, para la reacción de la sortasa y para la unión al dendrímero, conformando la siguiente molécula:

(cooh-GGGKEEKLQLQPFQPELPYPQPELPYPQPELPYPQPQPFKEEC-NH<sub>2</sub>).

En la cola de poliglicina es donde se va a unir el glicopéptido por la acción de la sortasa, que tiene lugar al poner todos los componentes en el buffer adecuado (Sigma/Aldrich, EEUU) durante 72 horas a 37°C. En el extremo amino-terminal nos queda la cisteína que tiene un grupo sulfhidrilo que reacciona con una hidrazida en el grupo funcional del dendrímero. Los otros 4 residuos facilitan la hidrosolubilidad del péptido, proporciona lugares sensibles a endoproteasas para facilitar la liberación de los péptidos de los dendrímeros y proporcionan la química necesaria para la síntesis de los dendrímeros. El esquema resultante sería el siguiente (figura 7)



**Figura 7: Glicocompuestos dendrimericos derivados del 33mer desaminado.** Unión del 33mer desaminado a los diferentes glicanos mediante la reacción de la sortasa A y al dendrímero mediante las secuencias de unión.

Los dendrímeros utilizados en este trabajo son los dendrímeros de Poli-Amido-Amina desarrollados por Dendritech, 3<sup>a</sup> Generación (Dendritech Inc, EEUU). Sus características son, un peso molecular de 6909 g/mol, 3.6nm de diámetro y 32 grupos en su superficie. Pero no sólo sintetizamos glicopéptidos unidos a dendrímeros sino que también se sintetizaron glicopéptidos del péptido d33mer sin dendrímero, para estudiar las diferencias entre ambos.

Tras la reacción de la sortasa, todo el contenido obtenido se purificó mediante columnas de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, *High performance liquid chromatography*) para separar las distintas fracciones resultantes de acuerdo a su tamaño. Una vez finalizada la purificación por HPLC se realiza una segunda purificación por columnas de densidad PD MiniTrap G25 (GE Healthcare, Reino Unido) según el protocolo del fabricante. Después de ello se realizó la medición de la concentración por BCA Protein-Assay (kit comercial, Sigma-Aldrich, EEUU) según instrucciones del fabricante. La especificidad se midió a través de la técnica de enzimoimmunoanálisis (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay) utilizando anticuerpos específicos frente a los carbohidratos utilizados para determinar si estos se han unido a los dendrímeros del péptido d33mer (el protocolo será detallado en el apartado de ELISA). Tras comparar los resultados del HPLC con los de ELISA, pudimos determinar las fracciones de cada reacción de sortasa que contienen específicamente los compuestos que nos interesan (carbohidrato-d33mer-dendrímero o carbohidrato-d33mer).

Se detallan todas las fracciones en la tabla 3. Únicamente las fracciones D3 (con dendrímero) y P0 resultaron ser los glicocompuestos deseados puros, por lo que el resto se desechó. Todos los glicocompuestos se dejaron a una concentración final de 500µg/ml para su utilización.

#### 4.- MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo	Glicano	Fracción HPLC	[ug/ml]	Volumen	Código
Dendrimeros	LeA	B3-B6	35	800	D1LeA
		B7-B9	35	600	D2LeA
		B10-C2	500	2003	D3LeA
		C3-C8	35	1200	D4LeA
	LeB	B3-B6	35	800	D1LeB
		B7-B9	35	600	D2LeB
		B10-C2	500	2040	D3LeB
		C3-C8	35	1200	D4LeB
	LeX	B3-B6	35	800	D1LeX
		B7-B9	35	600	D2LeX
		B10-C2	500	1694	D3LeX
		C3-C8	35	1200	D4LeX
	SLN302	B3-B6	35	800	D1Sia3
		B7-B9	35	600	D2Sia3
		B10-C2	500	2444	D3Sia3
		C3-C8	35	1200	D4Sia3
	SLN306	B4-B6	35	600	D1Sia6
		B7-B9	35	600	D2Sia6
		B10-C2	500	1754	D3Sia6
		C3-C8	35	1200	D4Sia6
	MH	B3-B6	35	800	D1MH
		B7-B9	35	600	D2MH
		B10-C2	500	1326	D3MH
		C3-C8	35	1200	D4MH
L404	B3-B6	35	800	D1LN	
	B7-B9	35	600	D2LN	
	B10-C2	500	1666	D3LN	
	C3-C8	35	1200	D4LN	
G283	B4-B6	35	600	D1Tn	
	B7-B9	35	600	D2Tn	
	B10-C2	500	3011	D3Tn	
	C3-C7	35	1000	D4Tn	
Péptidos	LeA		500	3192	P0LeA
	LeB		500	2474	P0LeB
	LeX		500	2278	P0LeX
	SLN302		-	-	
	SLN306		500	2527	P0Sia6
	MH		500	2961	P0MH
	L404		500	3361	P0LN
	G283		500	3385	P0Tn

**Tabla 3: Diferentes fracciones de los glico-compuestos formados mediante reacción de la sortasa A y tras la purificación por HPLC.** En la tabla se especifica la concentración a la que se obtuvieron, el volumen final y el código asignado para los siguientes experimentos.

### 4.7 Estimulación de células dendríticas con péptidos derivados de la gliadina y con compuestos glicosilados del péptido 33mer desaminado.

Para el estudio del efecto inmunogénico del péptido 8mer desaminado, se utilizaron CD aisladas y enriquecidas a partir de CMSP (tal y como se detalla en el apartado 4.5). Una vez obtenidas las CD, se estimularon durante 24h con los péptidos correspondientes (d8mer, 19mer, d33mer, c8mer) todos ellos a concentración 100µg/ml. La incubación se realizó a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Como control positivo de activación de las CD se utilizó LPS a concentración 1µg/ml. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizaron 2 lavados con MC (t=5', TA, 1500 rpm, con freno) para eliminar los péptidos y el LPS y se resuspendieron las células en MC para los ensayos de linfoproliferación autóloga. Una segunda parte de las CD estimuladas se resuspendió en FACS buffer para realizar citometría de flujo y una tercera parte se guardó en Trizol® (Invitrogen, Life Technologies, EEUU), para el análisis molecular.

Para los ensayos de modulación de la respuesta inmunitaria mediante glicosilación del péptido 33mer desaminado se utilizaron CD derivadas de monocitos (CDmo). Al sexto día de diferenciación, las CDmo son CDi (tal y como se detalla en el apartado 4.5) y se pusieron en placa de 96 pocillos en U a razón de 100000 CDi por pocillo en 200µl de MC, donde se añadieron 20 µl de cada uno de los compuestos (glicopéptidos con y sin dendrímero) para una concentración final de 50 µg/ml. El experimento se hace por duplicado con el motivo de que en el duplo se añade LPS a concentración 1µg/ml. Como control del experimento se añaden 100000 CDi en 200 µl de MC y cada condición se repitió por triplicado. Este experimento fue repetido en tres ocasiones diferentes. La estimulación se prolongó durante 18h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> (durante 6h para el análisis molecular). Tras la estimulación de las CD, se recogieron las células y se realizaron 2 lavados con FACS buffer (t=5', T=4°C, 1500 rpm, con freno) para eliminar los glicocompuestos. Las células se dejaron preparadas en FACS buffer para los estudios de maduración por citometría de flujo y una parte se introdujo en Trizol para realizar el análisis molecular correspondiente. El sobrenadante resultante del cultivo de las CD se guardó para el estudio de proteína secretada, mediante ELISA.

## 4.- MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.8. Obtención, separación magnética y marcaje con CFSE de linfocitos T de sangre periférica.

Una vez transcurridas 18h de incubación de las CMSP en Flask y recogidas las células no adherentes, se utilizaron la mitad de CMSP (la otra mitad es utilizada para el enriquecimiento de CD) para la obtención de linfocitos T. Para ello se centrifugaron las CMSP no adherentes ( $t=5'$ ,  $T=4^{\circ}\text{C}$ , 1500 rpm, con freno). Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en Minimacs Buffer (PBS 500ml, 0.37g EDTA, 2.5g ASB [albúmina sérica bovina]). Se volvió a centrifugar las células ( $t=5'$ ,  $T=4^{\circ}\text{C}$ , 1500 rpm, con freno), decantamos el sobrenadante y se resuspendieron las células en 100 $\mu\text{l}$  de Minimacs Buffer. Se añadieron 30 $\mu\text{l}$  de cada uno de los anticuerpos con bolas magnéticas (anti-CD14, anti-CD19, anti-HLA-DR, todos ellos de Miltenyi Biotec, Alemania). Se incubaron las células 20min a  $4^{\circ}\text{C}$ , en oscuridad. Mientras tanto se preparó el soporte magnético y las columnas de separación magnética (Miltenyi Biotec, Alemania) según instrucciones del fabricante.

Después de la incubación de las células con los anticuerpos magnéticos se realizaron 2 lavados con Minimacs buffer ( $t=5'$ ,  $T=4^{\circ}\text{C}$ , 1500 rpm, con freno). Se decantó el sobrenadante, resuspendemos las células en 1ml de Minimacs buffer y se transfirió a la columna de separación magnética. Esperamos a que se filtre completamente. Se retiró el tubo de recolección donde tendremos linfocitos T por selección negativa. Para asegurarnos la obtención de una población homogénea de linfocitos T, repetimos el proceso con una nueva columna de separación magnética. Al finalizar el filtrado, se realizaron 2 lavados más con PBS ( $t=5'$ ,  $T=4^{\circ}\text{C}$ , 1500 rpm, con freno) y se marcaron las células con CFSE.

Para ello se utilizó ester succinimidil diacetato carboxifluoresceina (CFSE, *carboxyfluorescein succinimidyl ester*, Molecular Probes, Life Technologies, EEUU) reconstituido en DMSO (Dimetil Sulfóxido, Sigma/Aldrich, EEUU) a concentración final de 5mM para el marcaje. Las células se resuspendieron en PBS. Después se añadió el CFSE para marcar las células a una concentración de 5 $\mu\text{M}$ , añadiéndose 1 $\mu\text{l}$  de CFSE por ml de solución. El tubo con las células se incubó durante 3min a TA, volteándose cada 30". La reacción se detiene añadiendo un volumen de SFB seguido de centrifugación a 1500 rpm durante 5', con freno. Posteriormente, se realizaron 2 lavados con MC ( $t=5'$ ,  $T=4^{\circ}\text{C}$ , 1500 rpm, con freno), se decantó y se añadió MC para realizar el conteo de las células con azul de Trypan.

### 4.9. Ensayos de proliferación de linfocitos T autólogo y heterólogo.

Para el estudio del efecto inmunogénico de los péptidos d8mer, d33mer y 19mer se realizó un linfoproliferativo autólogo. Para ello utilizaremos las CD y los linfocitos T marcados con CFSE, obtenidos por las técnicas descritas anteriormente, a partir de las CMSP de un mismo paciente. En una placa de 96 pocillos con fondo en “u”, se sembraron 400000 linfocitos T en 200µl de MC por pocillo. Después se añadió un número de CD determinado previamente estimuladas (como se ha descrito anteriormente en el apartado 4.7), representando el 1%, 2% o 3% del total de linfocitos T. Se incubó el co-cultivo durante 5 días a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Como control negativo se utilizaron linfocitos T marcados con CFSE a los que no se les añade CD. Como control positivo del ensayo de linfoproliferación se utilizó fitohemaglutinina (PHA, *Phytohaemagglutinin*) a concentración 1µg/ml. Se utilizó también un basal de CD no estimuladas previamente donde se añadieron linfocitos T marcados con CFSE. Transcurridos los 5 días, se realizaron 2 lavados con PBS-1%SFB, teniendo las células listas para realizar el marcaje de superficie e intracito y análisis de la linfoproliferación mediante citometría de flujo.

En el diseño experimental para el estudio de la modulación de la respuesta inmunitaria en EC mediante la glicosilación del 33mer se realizó un linfoproliferativo heterólogo. El ensayo consistió en el cultivo de CD irradiadas (la irradiación permite dañar el material genético de la célula impidiendo su proliferación o modificación, es decir, la célula únicamente puede cumplir la función que estuviera llevando a cabo en el momento de la irradiación) de donantes DQ2/DQ8 con 3 concentraciones diferentes de nuestros compuestos (0.3µg/ml, 1µg/ml, 3µg/ml) durante 2 h a 37°C. Después se realizó un cocultivo de estas CD con linfocitos T reactivos frente al gluten, provenientes de las líneas celulares proporcionadas por cortesía del Dr. Fritz Koning (Leiden University, Holanda). En concreto se utilizaron Sacha2 (α9 specific T cell) y Sacha16 (α2 specific T cell). Se mantuvieron en cultivo durante 4 días, previamente marcadas con tritio para medir la linfoproliferación al finalizar este periodo mediante contadores de centelleo. Como control positivo se utilizaron linfocitos T reactivos madurados con citoquinas específicas que inducen su linfoproliferación y como control negativo linfocitos a los que no se les añadió nada. También se estudió la linfoproliferación frente al d33mer no modificado, en cadena sencilla o en disposición dendrimerica, y frente a la α-gliadina.

## 4.- MATERIAL Y MÉTODOS

Los valores obtenidos fueron representados en Unidades de Fluorescencia de Centelleo (UFC).

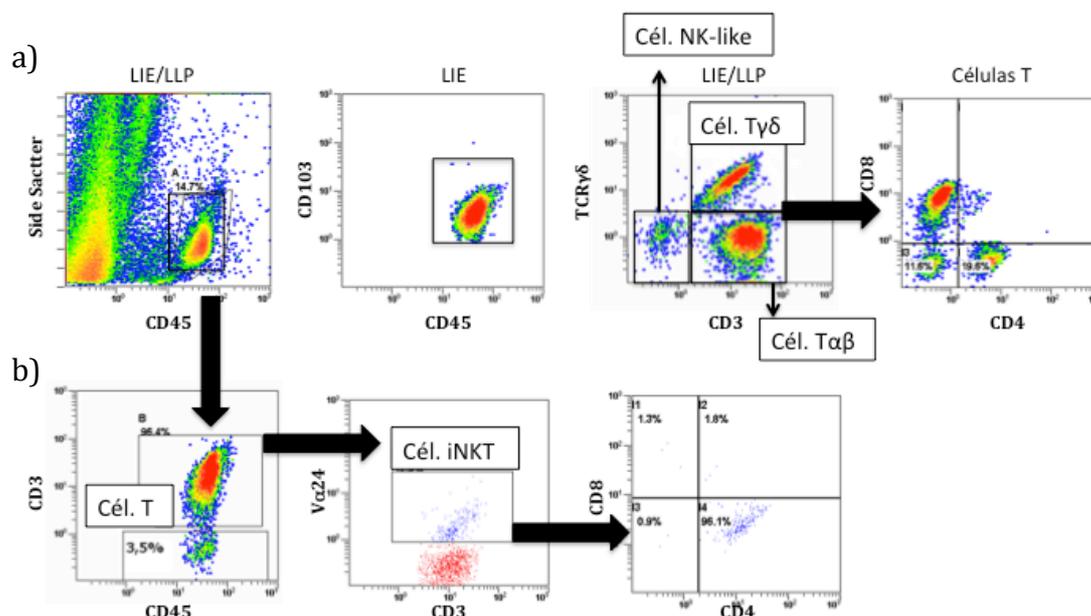
### 4.10. Tinción celular y estudio de marcadores de superficie por citometría de flujo.

Para el estudio de marcadores de superficie celular mediante citometría de flujo, se usaron PBS-1% SFB como buffer de lavado, y un mínimo de 50000 células por tinción y condición. Todas las tinciones incluyeron también el control isotópico apropiado. En todos los casos, una vez obtenidas, las células se lavaron dos veces con el buffer de lavado (PBS-1%SFB) (centrifugación:  $t=5'$ , TA, 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 realizarán otros dos lavados con el buffer de lavado (centrifugación  $t=5'$ , T A, 1800 rpm) para eliminar los anticuerpos que no se han unido a las células.

Para el fenotipaje de las poblaciones de LIE y LLP se utilizaron anticuerpos específicos para cada sub-población. Todos los LIE y LLP fueron identificados como  $\text{CD45}^+$  (marcador panleucocitario), mientras que los LIE también expresaban la  $\alpha$ -integrina  $\text{CD103}^+$ . Las subpoblaciones de células *NK-like* (fracción  $\text{CD3}^-$  de LIE), células T ( $\text{CD3}^+\text{TCR}\alpha\beta^+$ ), células  $\text{TCR}\gamma\delta$  ( $\text{CD3}^+\text{TCR}\gamma\delta^+$ ) (figura 8a) y células iNKT ( $\text{CD3}^+\text{V}\alpha 24^+$ ) (figura 8b) también fueron identificadas mediante citometría de flujo. Dentro de los linfocitos T ( $\text{CD3}^+\text{TCR}\alpha\beta^+$ ) y de las células iNKTs ( $\text{CD3}^+\text{V}\alpha 24^+$ ) se estudiaron las subpoblaciones de linfocitos  $\text{CD4}^+$  y  $\text{CD8}^+$  (figuras 8a y 8b).

Para el estudio de los marcadores de maduración y activación de células dendríticas ( $\text{CD14}^-$ ,  $\text{CD11c}^+$ ) se utilizaron anticuerpos frente a las moléculas HLA-DR, CD40, CD80, CD83 y CD86.

Los citómetros utilizados fueron el FACS Calibur (Becton Dickinson, EEUU) y el FC500 (Beckman Coulter, EEUU) con sus correspondientes programas de análisis. Toda la información relativa a los anticuerpos de citometría utilizados y sus fluorocromos conjugados se encuentra en la tabla 4.



**Figura 8: Identificación de linfocitos intraepiteliales y leucocitos de lamina propia mediante citometría de flujo.** (A) Ejemplo de caracterización de linfocitos intraepiteliales (LIE) / leucocitos de lamina propia (LLP) en un paciente celiaco en actividad. Se identificaron los LLP ( $CD45^+$ ) y los LIE ( $CD45^+CD103^+$ ) y dentro de ellos se estableció el porcentaje de: células  $TCR\alpha\beta$ , células  $TCR\gamma\delta$  y células *NK-like*. (B) Ejemplo de caracterización de células iNKT en un paciente celiaco en actividad: células  $CD45^+CD3^+V\alpha24^+$  del total de células  $CD45^+CD3^+$ , fenotipo de las iNKT ( $CD45^+CD3^+V\alpha24^+$ ) dependiendo de la expresión de CD4 y/o CD8 del total de iNKTs.

#### 4.11. Análisis por citometría de flujo de citocinas intracitoplasmáticas producidas por linfocitos T en los ensayos de linfoproliferación autólogos.

Se trata de determinar la capacidad de producción de  $IFN\gamma$  de los linfocitos T en los ensayos de linfoproliferación con péptidos derivados de la gliadina (d8mer, 19mer, d33mer y c8mer). En lugar de determinar su contenido directamente, se cuantificó la producción de dicha citocina en una ventana temporal de 4 horas. Para ello, el conjunto de células resultantes por condición tras el linfoproliferativo, se dividieron a la mitad y fueron cultivadas durante 4 horas ( $37^\circ C$ ,  $5\% CO_2$ ) en medio de cultivo basal con y sin suplementación de  $5\mu M$  de Monensina. A todas ellas se le añade una estimulación formada por Ionomicina a concentración  $2\mu M$  y acetato de forbol miristato  $10ng/ml$  (PMA, phorbol myristate acetate). Pasadas las 4 horas, las células fueron lavadas con FACS buffer y se procedió a su identificación mediante citometría de flujo. La comparación de los valores de  $IFN\gamma$  entre las células que han sido incubadas en presencia de Monensina y las que no (control negativo) permite cuantificar de manera

#### 4.- MATERIAL Y MÉTODOS

exacta y muy precisa diferencias en la capacidad de producción de la citocinas en una ventana temporal de 4 horas, además de utilizar el isotipo correspondiente. Dicho protocolo ha sido ampliamente validado por el Antigen Presentation Research Group del Imperial College, Reino Unido. Para cuantificarlo, se realizó una tinción intracelular con el anticuerpo anti-IFN $\gamma$  (BD, EEUU) (tabla 4).

Especificidad	Clon	Fluorocromo	Fabricante
CD3	HIT3a	APC	BD
CD4	13B8.2	FITC	Beckman Coulter
CD8	B9.11	PE	Beckman Coulter
CD11c	KB90	FITC	Dako
CD14	TÜK4	APC	BD
CD19	HIB19	PE	BD
CD40	LOB7/6	FITC	BD
CD45	HI30	PE-Cy7	BD
CD80	L307.4	FITC	BD
CD83	HB15e	PE	BD
CD86	BU63	FITC	Serotec
CD103	Ber-ACT8	FITC	BD
HLA-DR	G46-6	APC	R&D
IFN $\gamma$	25723,11	APC	BD
T $\gamma\delta$	B1	PE	BD
V $\alpha$ 24	6B11	PE	BD

**Tabla 4: Anticuerpos de citometría de flujo utilizados en los diferentes experimentos**, con sus respectivos fluorocromos asociados, clon de donde se obtuvieron y casa comercial. APC, alofocianina. FITC, fluoresceína. PE, ficoeritrina. PE-Cy7, ficoeritrina-cianina-7.

Primero se hizo la fijación y permeabilización de las células. Para ello se añadió lentamente paraformaldehído (PFA) al 2% sobre las células y se incubaron durante 10min a TA. Se realizó un lavado con FACS buffer (1200rpm, TA, t=5min). Posteriormente se hace un segundo lavado con saponina 0.1% en FACS buffer. Se incuban las células en saponina 0.1% y los anticuerpos superficiales de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (CD45<sup>+</sup>, TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>) y el anticuerpo intracitoplasmático anti-IFN $\gamma$  a concentración 1:10, durante 30min a TA. Tras el tiempo de incubación se lavan las células, para el eliminar el exceso de anticuerpos, con la solución de saponina 0.1% y se resuspenden en la misma solución para realizar el análisis por citometría de flujo. El

citómetro utilizado fue el FC500 (Beckman Coulter, EEUU) con su correspondiente programa de análisis.

### 4.12. Extracción de ARN de células y de explantes de biopsia.

La extracción de ARN de las biopsias conservadas en RNAlater o de las células conservadas directamente en Trizol se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante del Trizol® (Invitrogen–Life Technologies). Brevemente, el tejido se disgregó en 1ml de Trizol en un homogenizador mecánico, reposando 5 minutos a TA, mientras que las células se homogeneizaron mediante pipeteo. Después se añadieron 0.2ml de cloroformo, vórtex por 2-3 minutos, y centrifugación (12000rpm, t=15', T= 4°C) tras la que se separaron dos fases: la inferior orgánica que contiene el ácido desoxirribonucleico (ADN) y las proteínas, y la superior acuosa, con el ARN. El ARN 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 a TA, el ARN se resuspendió en agua libre de ARNasas. Posteriormente se midió la cantidad de ARN obtenido en un Nanodrop 2000c (ThermoScientific, EEUU), para adecuarlo a la concentración necesaria para realizar la PCR de retrotranscripción.

### 4.13. PCR de retrotranscripción y PCR cuantitativa.

En todos los casos, la cuantificación del ARNm se realizó por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR, *quantitative polymerase chain reaction*). En un primer paso se realizó una PCR de retrotranscripción (RT-PCR) para obtener ADN complementario (ADNc) que es mucho más estable que al ARNm. La RT-PCR se realizó usando el kit SuperScript® First-Strand Synthesis System for reverse Transcriptase (RT)-PCR Kit (Invitrogen, Life Technologies, USA) con iniciadores o *primers oligodT*.

#### 4.- MATERIAL Y MÉTODOS

Molécula	Secuencia primers	Ta
<b>GADPH</b>	Fw 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'	60
	Rv 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'	
<b>CCL19</b>	Fw 5'-ACACCTTGCATTTACCCCT-3'	60
	Rv 5'-GGGAAGTCCAGAGAACCAGC-3'	
<b>CCL21</b>	Fw 5'-CTCAGGACTGTTGCCTCAAG-3'	60
	Rv 5'-TCCTTTGGGTCTGCACATAGC-3'	
<b>CCL25</b>	Fw 5'-GATAAAACCGTCGCCCTACA-3'	58
	Rv 5'-TCCTTTGGGTCTGCACATAGC-3'	
<b>MADCAM1</b>	Fw 5'-CTGTACGGCCACAAAGTCA-3'	60
	Rv 5'-TCTGTCACCCTGAACAGCAC-3'	
<b>e-cadherina</b>	Fw 5'-CAGTCTTCTCTCACGCGT-3'	60
	Rv 5'-TGAGGATGGTGAAGCGATGG-3'	
<b><math>\beta</math>-actina</b>	Fw: 5'-ATGGGTCAGAAGGATTCCTAT GTG-3'	60
	Rv: 5'-CTTCATGAGGTAGTCAGTCAGGTC-3'	
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Fw: 5'-TGAAAGAGGAGAGTGACAG-3'	60
	Rv: 5'-ATTCATGTCTTCCTTGATGG-3'	
<b>Va24</b>	Fw: 5'-CTGGAGGGAAAGAACTGC-3'	65
	Rv: 5'-TGTCAGGGAAACAGGACC-3'	
<b>FoxP3</b>	Fw: 5'-CAGCACATTCCCAGAGTTCCTC-3'	60
	Rv: 5'-GCGTGTGAACCAGTGGTAGATC-3'	
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Fw: 5'-TCAGATCATCTTCTCGAACC-3'	60
	Rv: 5'-CAGATAGATGGGCTCATACC-3'	
<b>IL-10</b>	Hs00174086_ml_Applied	—
<b>IL-4</b>	Fw: 5'-TTCTACAGCCACCATGAG-3'	59
	Rv: 5'-CATGATCTCTTTAGCTTTTC-3'	
<b>IL-6</b>	Hs00985639_m1_Applied	—
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Fw: 5'GGACACCAACTATTGCTTCAG-3'	60
	Rv: 5'-TCCAGGCTCCAAATGTAGG-3'	
<b>IL-23p19</b>	Fw: 5'-AGCAGCTCAAGGATGGCACTCAG-3'	60
	Rv: 5'-CCCCAAATTTCCCTCCCATCTA-3'	

**Tabla 5: Primers utilizados en la PCR cuantitativa.** En esta tabla se detalla el primer Forward (Fw) y el primer Reverse (Rv) de cada una de las moléculas estudiadas en los diferentes abordajes experimentales, así como la temperatura de anillamiento necesaria (Ta) para su correcto funcionamiento.

Para la qPCR se utilizó una curva de calibración construida con diluciones seriadas de ADNc de líneas celulares estimuladas que expresaban la molécula bajo estudio, usándose los genes  $\beta$ -actina y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH, *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) como genes *housekeeping* para normalizar las diferentes cantidades de ARN entre las muestras. Para la qPCR a tiempo real se utilizó un LightCycler® instrument (Roche Applied Science, Alemania). Las reacciones se realizaron con FastStart SYBR Green MasterMix (Roche) añadiendo Uracil DNA glicosilasa (UDG) (Roche) para prevenir contaminaciones cruzadas en qPCRs de diferentes muestras, en aquellos genes estudiados mediante *primers* convencionales. Para los iniciadores o *primers* utilizados con sonda específica comercial se utilizó el protocolo provisto por el fabricante. Los resultados fueron expresados como unidades arbitrarias del ratio molécula/ $\beta$ -actina o molécula/GADPH. Todas las moléculas que no presentaron niveles detectables de expresión tuvieron asignado un valor arbitrario de 0.1 Las secuencias de los *primers* usados y su tiempo de *annealing* y se especifican en la tabla 5.

La especificidad de todos los *primers* usados fue evaluada por partida doble. En primer lugar, antes de encargar los *primers* (MWG Biotech, Alemania), se obtuvo la secuencia del ADNc de todas las isoformas descritas de cada molécula desde el *Genbank* y se alineó con la secuencia de *primers* seleccionados mediante el software *Primer Blast* 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). Secundariamente, y una vez hecha la PCR, la especificidad de la amplificación fue estudiada tanto mediante la evaluación de los picos de *melting* como confirmando el tamaño molecular, en pares de bases, de los productos generados, mediante electroforesis en gel de agarosa.

#### **4.14. Análisis de la especificidad de los glicopéptidos obtenidos tras la reacción de la sortasa A y de la producción de citocinas por células dendríticas estimuladas con los glicopéptidos, mediante la técnica ELISA.**

Para la determinación de la especificidad de los glicopéptidos obtenidos tras la reacción de la sortasa A y la purificación por HPLC se realizó un ELISA con anticuerpos específicos para los carbohidratos utilizados (Lewis A, B, X, MH, Sia 3, Sia

#### 4.- MATERIAL Y MÉTODOS

6, Ln, Tn) (todos ellos producidos en el laboratorio del Department of Molecular Cell Biology and Immunology, VU University Medical Center, Amsterdam, Holanda). Para ello se colocaron los glicopéptidos a concentración 500 µg/ml en los pocillos de una placa de ELISA. Se añadió el buffer de adhesión (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 9.2, 0.05M) y se incubó a 4°C durante toda la noche. Para realizar la curva de concentración se utilizó cada uno de los carbohidratos por separado a diferentes concentraciones. Después de la incubación se realizaron varios lavados con PBS 1%, se añadió PBA (PBS 1%+ASB1%) y se incubó la placa 30min a 37°C. Se eliminó el PBA y se añadió el anticuerpo primario (específico para cada uno de los hidratos de carbono utilizados, Department of Molecular Cell Biology and Immunology, VU University Medical Center, Amsterdam, Holanda) a concentración 1µg/ml. Se incubó la placa durante 2h a TA en agitación. Se realizaron 4 lavados con PBS 1%. Posteriormente, se añadió el anticuerpo secundario (GmIgM-peroxidasa, Department of Molecular Cell Biology and Immunology, VU University Medical Center, Amsterdam, Holanda) a concentración 1:2000. Se incubó la placa 1h a TA en agitación. Se realizaron 4 lavados con PBS1%. Se añadió el buffer de revelado (10mg/ml tetrametilbencidina [TMB], H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.1M NaAc, 0.1M ácido cítrico) y se detiene la reacción con el buffer de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

Para la determinación de las citocinas IL-10, IL-1β, IL-6 e IL-12p70 en el sobrenadante de las CD estimuladas con los glicopéptidos se utilizaron kits comerciales para cada una de ellas y se siguió las instrucciones del fabricante (todos los kits son de Sigma/Aldrich, EEUU). Las placas de ELISA fueron medidas en el lector de placas UVM340 (Asys Hitech GmbH, Eugendorf, Austria).

#### **4.15. Ensayos de captación y unión de los glicopéptidos derivados del 33mer desaminado a células mononucleares de sangre periférica.**

Para determinar si las CD y solo éstas, eran capaces de captar nuestros compuestos para su procesamiento y posterior presentación antigénica, se marcaron todos los compuestos con el fluorocromo ATTO-633 al 0.5% (BD, EEUU). Se incubaron durante 30min a TA. Después se purificaron mediante columnas de densidad PD MiniTrap G25 (GE Healthcare, Reino Unido) para eliminar los residuos resultantes del marcaje con el fluorocromo.

Se realizó un cultivo de 2h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> con los diferentes glico-compuestos marcados con ATTO-633 con CMSP de dos donantes diferentes no

celiacos y CDi provenientes de monocitos en el sexto día de diferenciación. Tras la incubación de 2h se marcaron las CMSP con anticuerpos de citometría anti-CD19, CD14 y CD11c con el fin de diferenciar entre monocitos, células dendríticas y linfocitos B y se analizaron las diferentes subpoblaciones mediante citometría de flujo, para determinar si se había producido la captación del péptido correspondiente.

### **4.16. Expresión de DC-SIGN en biopsias duodenales mediante microscopía de fluorescencia.**

Biopsias duodenales provenientes de pacientes control (C-NoEC), celíacos activos (aEC) y pacientes celíacos en DSG (DSG-EC) fueron lavadas tres veces en PBS. Posteriormente se embebieron en el componente de temperatura para corte óptimo (OCT, *Optimal Cutting Temperature compound*) y se congelaron en nitrógeno líquido para su conservación a -80°C. Después se realizaron cortes de tejido de 8µm mediante un criotomo y se adherieron directamente a portas marcados donde se dejó secar durante toda la noche. Para fijar las secciones de tejido, se utilizó una solución de acetona. Para rehidratar el tejido se lavó con PBS. El bloqueo se realizó con una solución del 3% de ASB en PBS antes de realizar el marcaje inmunofluorescente.

El marcaje fue realizado añadiendo los anticuerpos, anti-DC-SIGN [1:1000], marcado con AlexaFluor 488 [1:500] y anti-HLA-DR o anti-CD4 ambos a [1:500], marcados con AlexaFluor 647 [1:500] (todos ellos de BD, EEUU). Se incubaron durante 1h a TA. Se utilizaron los isotipos correspondientes para ver el ruido de fondo. Los cubreportas fueron montados utilizando el medio comercial Vinol (alcohol de polivinilo, Sigma-Aldrich, EEUU) en el que se incluyó 4',6-diamino-2-fenilindol o DAPI a concentración 1:10000, para marcar el ADN nuclear. Para la visualización de los cortes se utilizó un microscopio de inmunofluorescencia Leica DM6000 (Leica Microsystems AG, Alemania). Para el análisis de las imágenes se utilizó el software Leica Application Suite for Advanced Fluorescence (Leica Microsystems, versión 2.3.5, Alemania).

### **4.17. Análisis estadístico de los resultados.**

Para realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos en los diferentes abordajes experimentales se utilizó el software GraphPad Prism para MAC OS X

#### **4.- MATERIAL Y MÉTODOS**

---

(versión 5.0a, GraphPad software Inc. EEUU). Los diferentes test estadísticos utilizados, así como sus resultados se detallan en cada apartado específico dentro de los resultados. Valores de  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos. (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

## **5.- RESULTADOS**

---

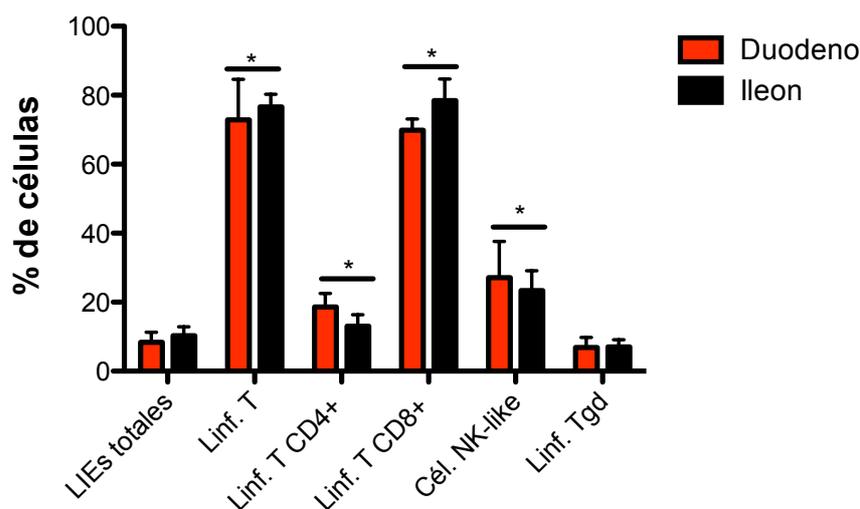
## 5.- RESULTADOS

---

### 5.1. Distribución de los linfocitos intraepiteliales a lo largo del intestino.

#### 5.1A. Variaciones de los linfocitos intraepiteliales en el intestino delgado de individuos sanos.

El estudio incluyó 24 pacientes, 12 No-EC y 12 No-EII, en los que se tomó una muestra de biopsia por paciente (Duodeno, n=12; íleon, n=12). Todos fueron adultos (rango de edad: 19-78 años, media de edad: 39, 58.9% varones). Los resultados de la citometría de flujo han sido expresados como porcentajes y analizados mediante el test no-paramétrico U de Mann-Whitney. Valores de  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ). Como descriptivos estadísticos para cada una de las subpoblaciones de LIE se utilizaron la mediana de todos los porcentajes de las muestras analizadas con el rango intercuartil (RIQ).



**Figura 9: Fenotipo de los linfocitos intraepiteliales en el duodeno y en íleon de individuos sanos.** Fenotipo de los LIEs en el duodeno y en el íleon de pacientes C-NoEC y C-NoEII. Porcentaje de LIEs totales ( $CD103^+CD45^+$ ) respecto al total de células epiteliales. Porcentaje de linfocitos T ( $CD103^+CD45^+CD3^+$ ), NK-like ( $CD103^+CD45^+CD3^-$ ) y células  $T\gamma\delta$  ( $CD103^+CD45^+CD3^+TCR\gamma\delta^+$ ) respecto al total de LIEs. Porcentaje de linfocitos T  $CD4^+$  ( $CD103^+CD45^+CD3^+CD4^+$ ) y  $CD8^+$  ( $CD103^+CD45^+CD3^+CD8^+$ ) respecto al total de linfocitos T. Las barras horizontales representan la mediana y el rango intercuartil (RIQ). Las diferencias estadísticamente significativas se muestran en la gráfica (test no paramétrico U de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ).

El compartimento intraepitelial del íleon presenta un mayor porcentaje de linfocitos T (76.60, RIQ:4.28) comparado con el duodeno (72.85, RIQ:13.32). Además, aunque la subpoblación dominante en el compartimento epitelial son los linfocitos T  $CD8^+$  en ambas partes del intestino, la mucosa ileal (78.45, RIQ:4.30) presenta un

## 5.- RESULTADOS

aumento estadísticamente significativo de esta subpoblación respecto al duodeno (69.85, RIQ:4.55). Sin embargo, en el duodeno (18.60, RIQ:2.55) se observó un aumento estadísticamente significativo de la población de linfocitos T CD4+, respecto al íleon (13.05, RIQ:1.82). En el duodeno (27.15, RIQ:13.33) se encontró también un aumento de la población de células NK-like al compararlo con el íleon (23.40, RIQ:4.27). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al número total de LIE (duodeno: 8.40 RIQ=2.65, íleon: 10.30 RIQ=2.51) y de la subpoblación de linfocitos T $\gamma\delta$  (duodeno: 6.90 RIQ=2.48, íleon: 7.00 RIQ=2.05) al comparar ambos tramos intestinales (figura 9).

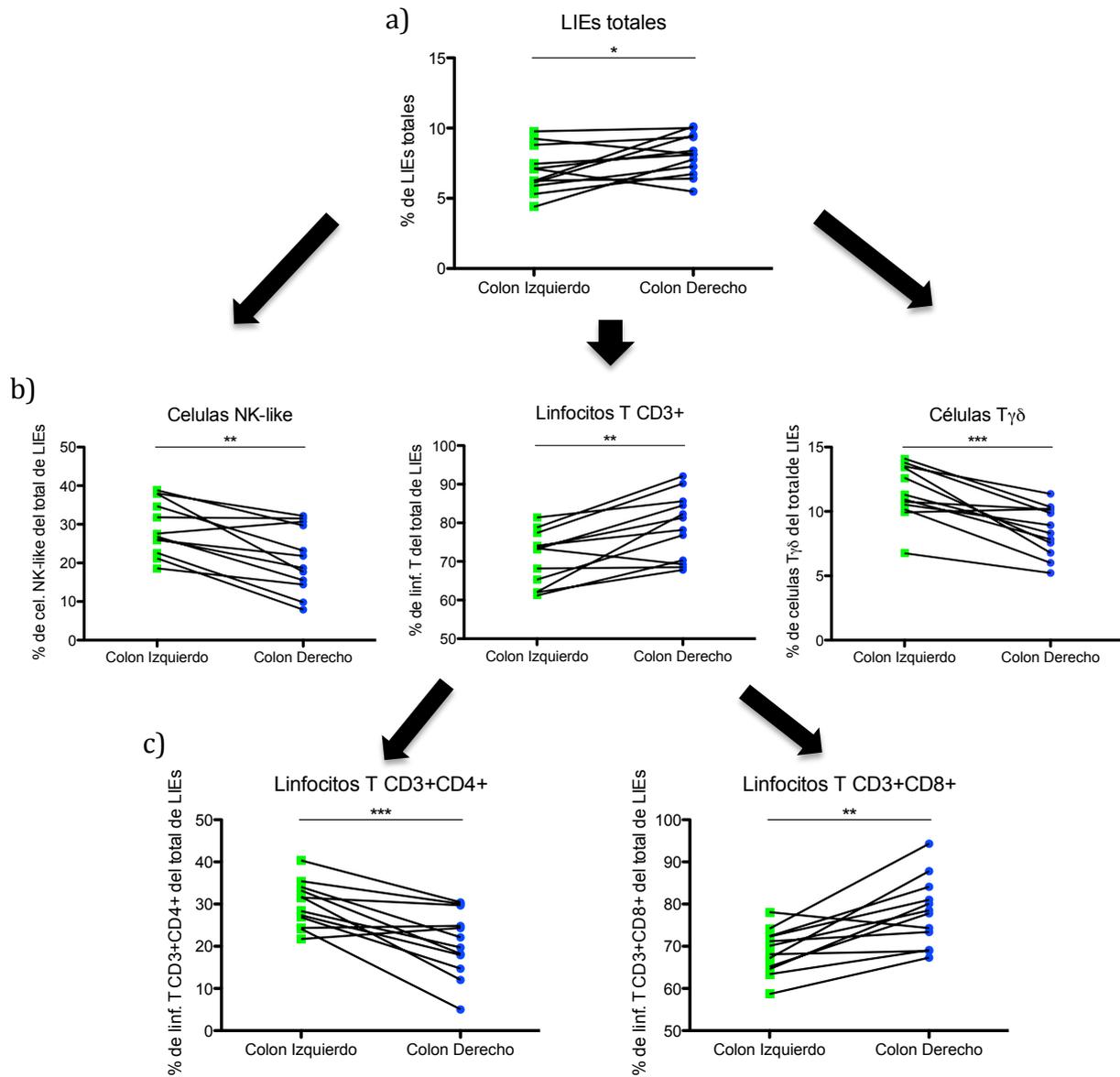
### 5.1B. Diferencias en las poblaciones de linfocitos intraepiteliales y en la expresión de ligandos de marcadores de migración intestinal entre el colon derecho y el colon izquierdo de individuos sanos.

A continuación nos planteamos el estudio de las poblaciones de LIE a lo largo del colon de pacientes sanos, además de valorar si existen diferencias entre el colon derecho o proximal y el colon izquierdo o distal, en relación con la expresión de genes relacionados con la migración de células del sistema inmunitario a la mucosa intestinal (ligando de quimiocinas C-C (CCL)-19, CCL21, CCL25, Madcam1, e-cadherina). Para ambos estudios se utilizaron biopsias obtenidas mediante colonoscopia, de 12 pacientes sanos adultos (rango de edad: 28-62 años, media de edad: 42.5, 62.4% varones). De cada uno de los pacientes se obtuvieron dos explantes del colon derecho (uno para citometría y otro para análisis molecular) y dos explantes del colon izquierdo (uno para citometría y otro para análisis molecular).

Los resultados de la citometría de flujo han sido expresados como porcentajes y analizados mediante la prueba *t de student* pareada. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de  $P < 0.05$  (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ), y se utilizaron como estadísticos descriptivos para cada una de las subpoblaciones de LIE se utilizaron la media de todos los porcentajes de las muestras analizadas con el error estándar de la media (EEM).

La expresión del ARNm de las diferentes moléculas estudiadas mediante qPCR ha sido expresada en unidades arbitrarias (U) normalizadas con el gen *housekeeping* GADPH. El análisis estadístico que se aplicó fue la prueba *t de student* pareada y los

valores de  $p < 0.005$  fueron considerados como estadísticamente significativos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).



**Figura 10: Linfocitos intraepiteliales a lo largo del colon humano.** (A) Los LIE fueron identificados como  $CD45^+CD103^+$  en biopsias pareadas (colon derecho e izquierdo) de cada individuo, (B) dentro de los LIE se estudiaron las poblaciones de linfocitos T ( $CD3^+T\alpha\beta^+$ ), linfocitos T $\gamma\delta$  ( $CD3^+T\gamma\delta^+$ ), y células NK-like ( $CD3^-$ ). (C) Dentro de los linfocitos T se identificaron las subpoblaciones de linfocitos T  $CD4^+$  y  $CD8^+$ . Se aplicó el test T pareado y los valores de  $p < 0.005$  fueron considerados significativos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ );).

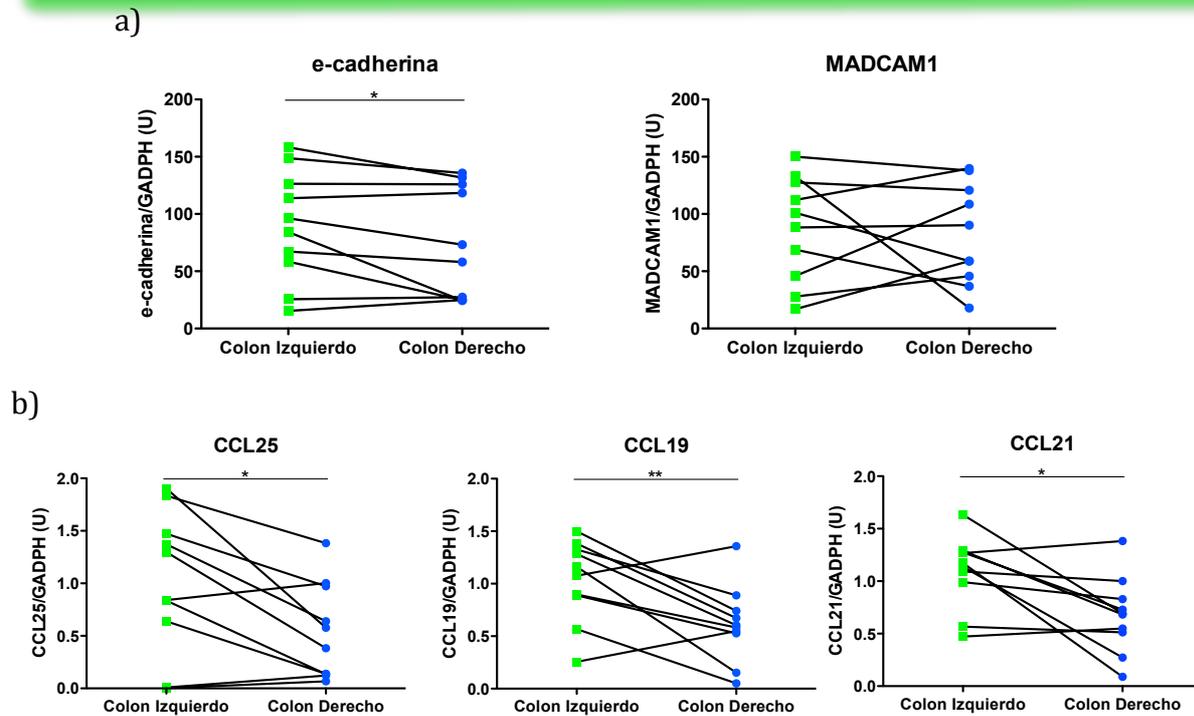
Los datos obtenidos por citometría de flujo de las diferentes poblaciones de LIE revelan que el colon derecho presenta un mayor porcentaje de LIE totales (colon derecho:  $8.10 \pm 0.42$ , colon izquierdo:  $6.97 \pm 0.46$ ) (figura 10A), donde se produce un mayor aumento de linfocitos T clásicos ( $CD3^+T\alpha\beta^+$ ) (colon derecho:  $78.40 \pm 2.46$ , colon

## 5.- RESULTADOS

izquierdo:  $70.91 \pm 2.01$ ), mientras que el número de linfocitos  $T\gamma\delta$  ( $CD3^+T\gamma\delta^+$ ) (colon derecho:  $8.54 \pm 0.55$ , colon izquierdo:  $11.48 \pm 0.61$ ) y las células *NK-like* (colon derecho:  $21.09 \pm 2.45$ , colon izquierdo:  $29.18 \pm 2.00$ ) estaba disminuido respecto al colon izquierdo (figura 10B). La subpoblación de linfocitos T  $CD8^+$  presentaba mayores valores en el colon derecho que en el colon izquierdo (colon derecho:  $78.05 \pm 3.42$ , colon izquierdo:  $68.79 \pm 1.54$ ), estando los linfocitos T  $CD4^+$  aumentados en este último (colon derecho:  $20.73 \pm 2.84$ , colon izquierdo:  $29.88 \pm 1.56$ ) (figura 10C).

Se analizó la expresión de ARNm de los ligandos de  $\beta 7$ . Como la molécula  $\beta 7$  puede co-expresar  $\alpha 4$  o  $\alpha E$ , el estudio incluyó la expresión de ARNm de MADCAM1 (ligando de  $\alpha 4\beta 7$ ) y e-cadherina (ligando de  $\alpha E\beta 7$ ) encontrando una disminución en la expresión de e-cadherina en el colon derecho ( $p < 0.05$ ) (figura 11A) que además se correlacionaba con la edad del donante (Pearson's  $r = 0.66$ ,  $p$ -valor =  $0.035$ ). CCR9, una molécula considerada tradicionalmente como un marcador de migración a intestino delgado se encuentra también en las CD del colon. El análisis molecular realizado en las biopsias de colon derecho e izquierdo demostraron que existe una disminución de la expresión de ARNm de su ligando CCL25 ( $p < 0.05$ ) en el colon derecho humano (figura 11B).

En estudios previos realizados por el Antigen Presentation Research Group (Imperial College London, Reino Unido) se observó que los niveles de CCR7 eran más bajos en las CD de colon de pacientes sanos, y que además estaban más disminuidas en el colon derecho (comunicación personal D. Bernardo), lo cual se correlaciona con nuestro hallazgo de niveles más bajos de expresión de ARNm de sus ligandos CCL19 ( $p < 0.01$ ) y CCL21 ( $p < 0.05$ ) en el colon derecho (figura 11B).

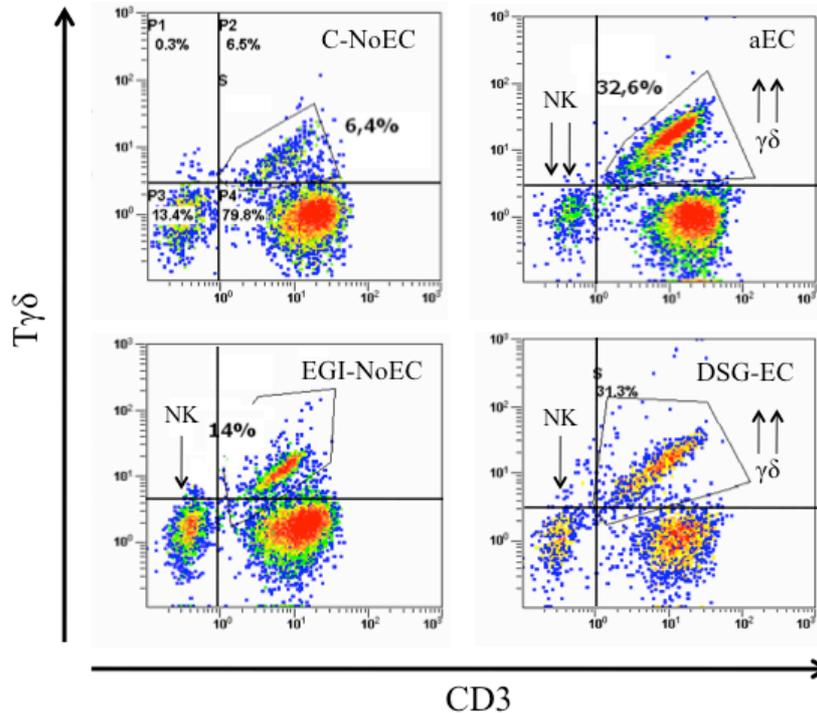


**Figura 11: Disminución en el colon derecho de los ligandos de los marcadores de migración intestinal de células dendríticas.** (A) Diferencias en la expresión de ARNm de los ligandos de  $\beta 7$ , MADCAM1 (ligando de  $\alpha 4\beta 7$ ) y e-cadherina (ligando de  $\alpha E\beta 7$ ) en biopsias de colon derecho e izquierdo de pacientes sanos. (B) Diferencias en la expresión de ARNm de CCL25 (ligando de CCR9), CCL19 y CCL21 (ligandos de CCR7) en biopsias de colon derecho e izquierdo de pacientes sanos. Niveles de expresión de ARNm medidos mediante qPCR, utilizando GADPH como *housekeeping*. Los resultados fueron representados en unidades arbitrarias (U) y analizados mediante el test T pareado. Valores de  $P < 0.05$  fueron considerados como estadísticamente significativos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

### 5.1C. Variaciones de las subpoblaciones de linfocitos intraepiteliales en el duodeno de pacientes con enfermedad celíaca.

Dada la relevancia diagnóstica de los LIE en la EC, se estudiaron los porcentajes de LIE totales ( $CD103^+CD45^+$ ), células NK-like ( $CD103^+CD45^+CD3^-CD7^+$ ), y células  $TCR\gamma\delta^+$  ( $CD103^+CD45^+CD3^+TCR\gamma\delta^+$ ) en muestras duodenales de pacientes que acudieron a consulta con sintomatología gastrointestinal. Se incluyó en el estudio un total de 60 individuos (rango de edad: 4-71 años, media de edad: 29.43, 37.8% varones) distribuidos en 15 pacientes en el grupo aEC, 15 en el grupo DSG-EC, 15 pacientes en el grupo EGI-NoEC y 15 en el grupo C-NoEC. Los resultados de la citometría de flujo han sido expresados como porcentajes y analizados mediante la prueba no-paramétrica U de Mann-Whitney. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de  $P < 0.05$  (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ), y se utilizaron como estadísticos descriptivos para cada una de las subpoblaciones de LIE la mediana de todos los porcentajes de las muestras analizadas con el rango intercuartil (RIQ).

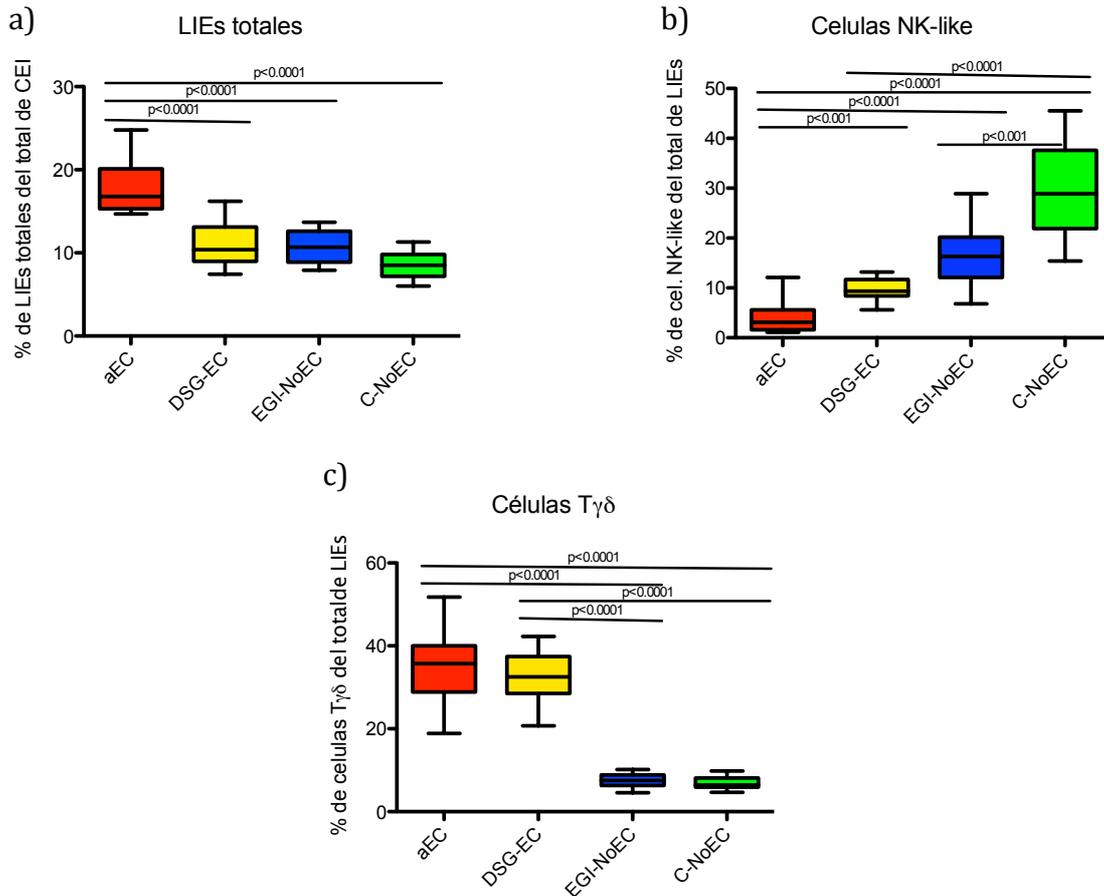
## 5.- RESULTADOS



**Figura 12: Ejemplo de caracterización de linfocitos intraepiteliales como herramienta diagnóstica en la enfermedad celíaca.** Fenotipo de los LIE de pacientes celíacos en actividad (aEC), pacientes celíacos en dieta sin gluten (DSG-EC), pacientes control con inflamación duodenal (EGI-NoEC) y pacientes control sin afectación duodenal (C-NoEC). Las subpoblaciones de LIE  $T\gamma\delta$  ( $CD103^+CD45^+CD3^+TCR\gamma\delta^+$ ) y células *NK-like* ( $CD103^+CD45^+CD3^+$ ) fueron identificadas dentro del total de LIE. En los pacientes celíacos, tanto en actividad como en DSG se produce un aumento de los linfocitos  $T\gamma\delta$  en comparación con los pacientes control (C-NoEC y EGI-EC). Los pacientes aEC presentan una gran disminución de las células *NK-like* en comparación con los C-NoEC, que también se produce pero en mucha menor medida en los pacientes DSG-EC y EGI-NoEC.

Los pacientes celíacos en actividad presentaban un aumento de los LIE totales (figura 13A) junto con una disminución del porcentaje de células *NK-like*, que también se encontró en pacientes DSG-EC (figuras 12 y 13B) (donde no se observó un aumento de los LIE totales). Dentro de los linfocitos T, tanto los aEC como los DSG-EC presentaron un aumento de la fracción de linfocitos  $TCR\gamma\delta^+$  (figuras 12 y 13C) previamente descrito como la característica más importante en el diagnóstico de la EC por citometría de flujo (Leon et al., 2004). En consonancia con esto, los pacientes EGI-NoEC no mostraron este aumento de los linfocitos  $TCR\gamma\delta^+$  (figuras 12 y 13C) aunque en algunos casos se observó una disminución de la población de células *NK-like* (figuras 12 y 13B). Por lo tanto, el hallazgo conjunto del aumento de linfocitos  $TCR\gamma\delta^+$  junto con la disminución de células *NK-like*, representa un signo distintivo de EC, independientemente del estado de la enfermedad. Las medianas obtenidas de los porcentajes de las distintas subpoblaciones de LIE para cada grupo de pacientes están representados en la tabla 6. Al contrario que en el compartimento intraepitelial, donde

se produce un patron característico de EC, la distribución de los LLP es mucho más heterogénea y no presenta variaciones características de EC (datos no mostrados).



**Figura 13: Fenotipo de los linfocitos intraepiteliales en el duodeno de los pacientes celíacos.** Fenotipo de LIE en pacientes celíacos no tratados (aEC), pacientes celíacos en DSG DSG-EC, pacientes no celíacos con el duodeno inflamado (EGI-NoEC) y pacientes control sin afectación del duodeno (C-NoEC). (A) Porcentaje de LIE totales (CD103<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>) respecto al total de células epiteliales. (B) Porcentaje de células NK-like (CD103<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) y (C) Tγδ (CD103<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>TCRγδ<sup>+</sup>) respecto al total de LIE. Las barras horizontales son las medianas, valor máximo, valor mínimo y los percentiles 25% y 75%. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran en las gráficas (prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, p<0.05)

Tabla 6	aEC	DSG-EC	EGI-NoEC	C-NoEC
<b>LIEs totales</b>	16.80/4.80	10.40/4.11	10.70/3.70	8.50/2.60
<b>Células NK-like</b>	3.10/4.00	9.34/3.34	16.30/8.12	28.90/15.75
<b>Células TCRγδ<sup>+</sup></b>	35.78/11.13	32.50/8.90	7.51/2.60	6.44/2.38

**Tabla 6: Variaciones en el número de las subpoblaciones de linfocitos intraepiteliales en el diagnóstico de la enfermedad celíaca.** Porcentajes de las diferentes poblaciones de LIE en pacientes celíacos no tratados (aEC), pacientes celíacos en DSG DSG-EC, pacientes no celíacos con el duodeno inflamado (EGI-NoEC) y pacientes control sin afectación del duodeno (C-NoEC) expresados como mediana con el rango intercuartil (RIQ).

## 5.- RESULTADOS

### 5.2. Aumento de células $V\alpha 24^+$ NKT invariantes en el duodeno celíaco.

Se recogieron biopsias duodenales de 2 poblaciones independientes, en España (Hospital Clínico Universitario de Valladolid) y Argentina (Biobank del LISIN, La Plata). La población española incluyó 25 pacientes aEC (edad media: 28.9 años; rango 5-76 años; 42% varones), 15 pacientes celíacos en DSG (DSG-EC; edad media: 34.2 años; rango 4-71 años; 34% varones), 15 pacientes con alguna otra patología duodenal diferente de la EC (EGI-NoEC, edad media 42.1 años; rango 15-78 años; 56% varones) y 25 pacientes control que no presentaron ninguna patología gastrointestinal que afectara al duodeno (C-NoEC; edad media 38.3 años; rango 6-81 años; 30% varones). La población argentina incluyó 20 pacientes aEC (edad media 24.8 años; rango 4-56 años; 28% varones) y 19 C-NoEC (edad media 31.4 años; rango 6-62 años; 52% varones).

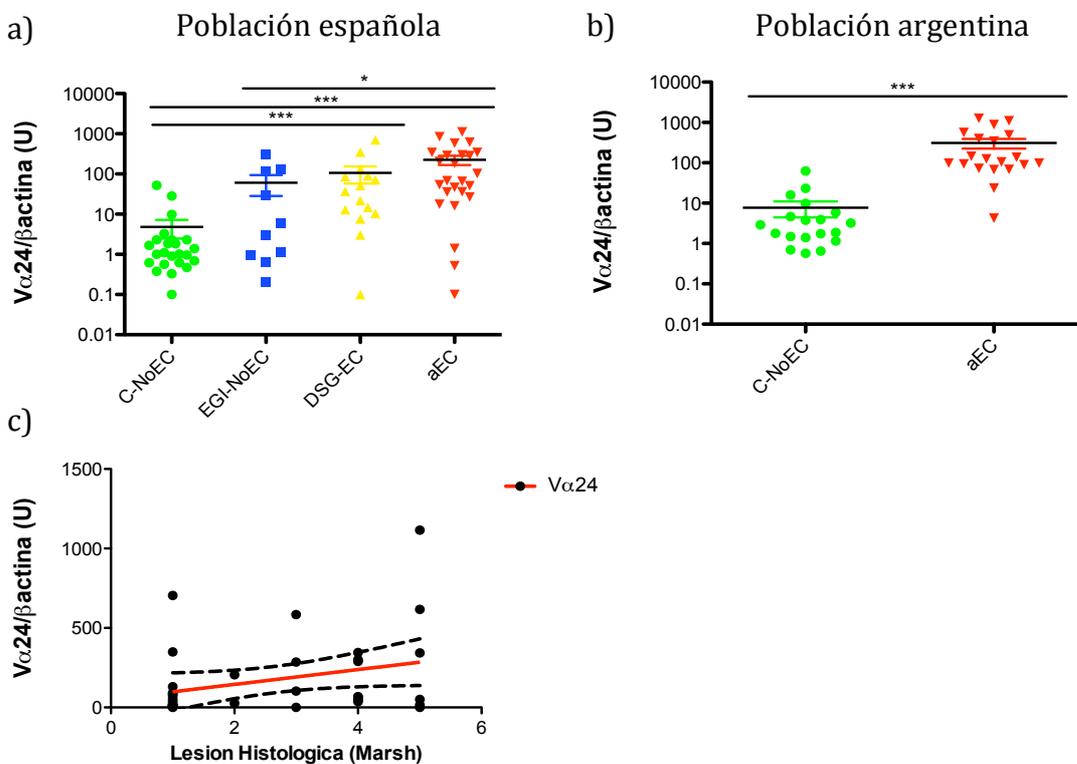
Los análisis de correlación y los análisis estadísticos no paramétricos fueron realizados usando el test U de Mann-Whitney y la correlación de Spearman. Los resultados de citometría de flujo fueron expresados como porcentajes. Los resultados de qPCR se expresaron como ratio molécula/ $\beta$ actina en unidades arbitrarias (U). Como descriptores estadísticos se utilizaron la mediana y el rango intercuartil. Valores de  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos. (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

#### 5.2A. Incremento de la expresión de ARNm de $V\alpha 24$ en los pacientes celíacos.

Dado el bajo número de células iNKT, tanto en la sangre (Bernardo et al., 2008) como en los diferentes tejidos (Middendorp and Nieuwenhuis, 2009), decidimos realizar un primer abordaje para establecer la proporción de células iNKT en la mucosa duodenal mediante el análisis de la expresión de ARNm de la molécula invariante  $V\alpha 24$ , restrictiva de células iNKT (Bernardo et al., 2008; van der Vliet et al., 2001).

Los pacientes aEC mostraron un incremento de los niveles de expresión de  $V\alpha 24$  en comparación con los pacientes EGI-NoEC ( $p < 0.05$ ) y C-NoEC ( $p < 0.001$ ). Los pacientes DSG-EC presentaron un aumento de la expresión de esta molécula, únicamente en comparación con los C-NoEC ( $p < 0.001$ ) (figura 14A). No se encontraron diferencias entre los pacientes aEC y DSG-EC, lo que sugiere un incremento de la carga de células iNKT en la mucosa duodenal de ambos grupos,

independientemente del estado de la enfermedad (figura 14A). También se realizó el análisis de la expresión de ARNm de  $V\alpha 24$  en una población independiente proveniente de Argentina. La figura 14B confirma que los pacientes aEC presentan un incremento duodenal de la expresión de ARNm de  $V\alpha 24$  comparado con los C-NoEC ( $p < 0.001$ ), independientemente del origen de las muestras. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la población argentina y española (datos no mostrados). Las muestras de pacientes DSG-EC mostraron una severidad de la lesión (según el índice de Marsh) de entre 0 y I, y no se encontraron diferencias en los niveles de expresión de  $V\alpha 24$ . Los pacientes aEC presentaron un grado de lesión entre I y IIIc, y en estos pacientes, los niveles de expresión de  $V\alpha 24$  mRNA se correlacionaron con el índice de Marsh (Spearman  $r = 0.063$ ,  $p < 0.05$ ) (figura 14C).



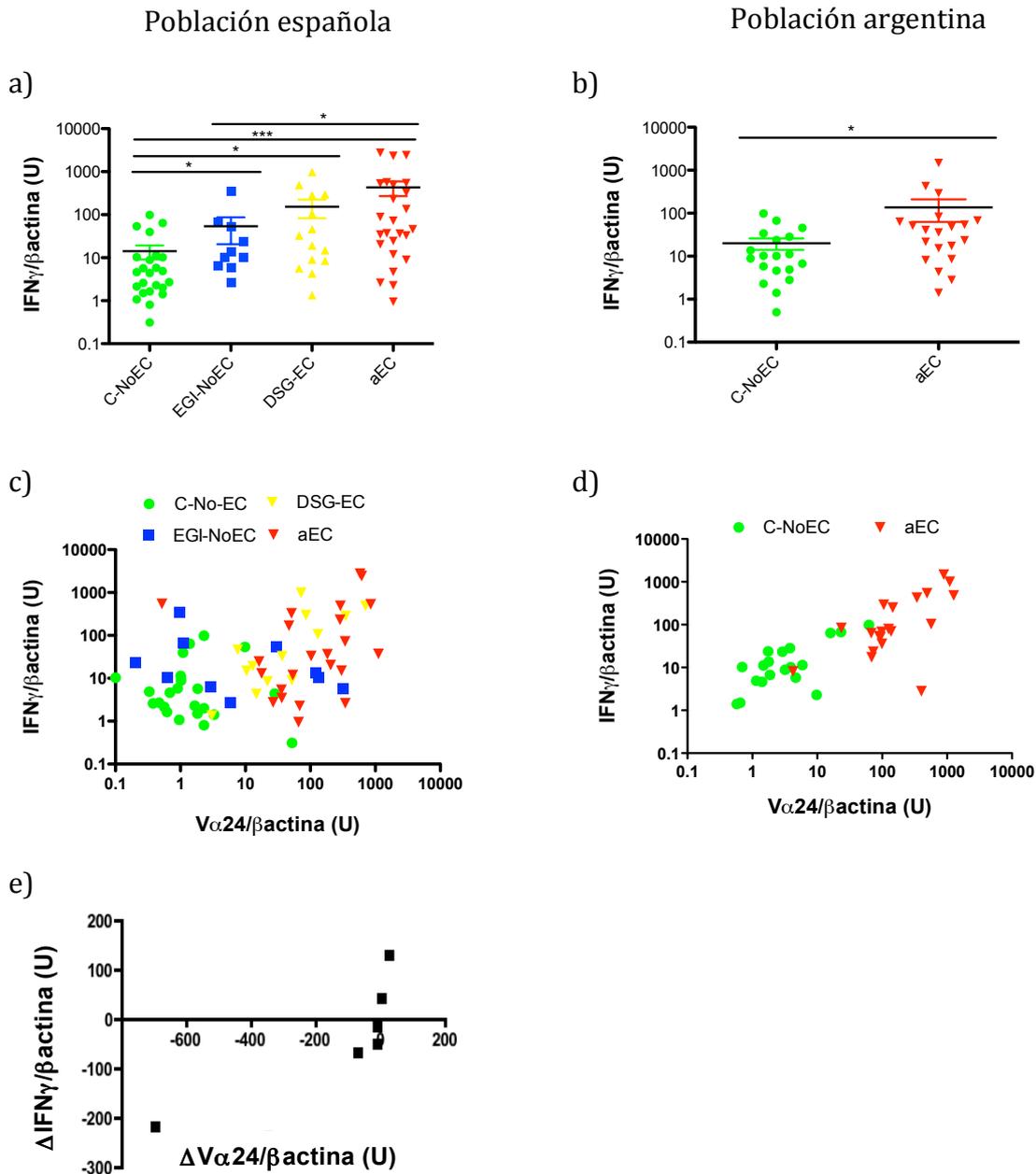
**Figura 14: Aumento de la expresión de ARNm de  $V\alpha 24$  en el duodeno de pacientes celíacos tratados y en dieta sin gluten.** (A) Niveles de expresión de ARNm de  $V\alpha 24$  en biopsias duodenales indicado como el ratio  $V\alpha 24/\beta actina$  y expresado en unidades arbitrarias (U), en celíacos activos (aEC), celíacos en dieta singluten (DSG-EC), pacientes con afectación duodenal por otra patología inflamatoria diferente de EC (EGI-NoEC) y pacientes control sin afectación duodenal (C-NoEC) en la población española y (B) en los aEC y C-NoEC. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran en los gráficos (prueba no-paramétrica U de Mann-Whitney. Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados significativos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ). Las barras horizontales representan el valor de la mediana y el RIQ. (C) Correlación entre el grado de lesión histológica (índice de Marsh) y el nivel de expresión de ARNm de  $V\alpha 24$  en pacientes celíacos (1: Marsh 0-I, 2: Marsh II, 3: Marsh IIIa, 4: Marsh IIIb, 5: Marsh IIIc). Se observó un incremento de la expresión de ARNm de  $V\alpha 24$  que se correlacionaba con el grado de atrofia vellositaria (Spearman  $r = 0.063$ ,  $p < 0.05$ ). Los pacientes DSG-EC mostraron Marsh 0-I mientras que los celíacos aEC mostraron atrofia Marsh II a IIIc. Los datos de esta gráfica han sido obtenidos en colaboración con el Dr. David Bernardo, actualmente en el Imperial College, Londres.

## 5.- RESULTADOS

### **5.2B. La expresión de ARNm de $V\alpha 24$ en el duodeno de pacientes celíacos se correlaciona con los niveles de $IFN\gamma$ tanto en biopsias en fresco como tras estimulación *in vitro* en biopsias de pacientes en dieta sin gluten.**

Las biopsias duodenales de pacientes celíacos (DSG-EC,  $p < 0.05$ ; aEC,  $p < 0.001$ ) presentan un aumento de la expresión de ARNm de  $IFN\gamma$  comparado con los controles C-No-EC, en la población española (figura 15A) que también se observó entre los aEC y los C-NoEC en la población argentina ( $p < 0.05$ ) (figura 15B) tal y como había sido descrito anteriormente por otros autores (Leon et al., 2007; Leon et al., 2005). Debido a que tanto los niveles de expresión de ARNm de  $IFN\gamma$  (Leon et al., 2007) como los de  $V\alpha 24$  (figura 14C), correlacionan con el grado de lesión mucosa (según el índice de Marsh), decidimos estudiar si la expresión duodenal de  $IFN\gamma$  y de  $V\alpha 24$  estaba relacionada. Encontramos una correlación entre los niveles de expresión de ARNm de  $IFN\gamma$  y de  $V\alpha 24$  en los pacientes celíacos tanto en la población española (C-NoEC: Spearman  $r = 0.3115$ ,  $p$  valor=n.s; EGI-NoEC: Spearman  $r = 0.4265$ ,  $p$  valor=n.s; DSG-EC: Spearman  $r = 0.5393$ ,  $p$  valor $< 0.05$ ; aEC: Spearman  $r = 0.4323$ ,  $p$  valor $< 0.05$ ) como en la argentina (C-NoEC: Spearman  $r = 0.5895$ ,  $p$  valor $< 0.05$ ; aEC: Spearman  $r = 0.6917$ ,  $p$  valor $< 0.001$ ) (figuras 15C y D).

Como las células iNKT son capaces de producir grandes cantidades de  $IFN\gamma$  en cortos periodos de tiempo (La Cava et al., 2006), el siguiente paso fue determinar si estas células podrían ser una fuente de  $IFN\gamma$  en la EC. Para investigar esto, cultivamos *in vitro* biopsias de pacientes en DSG con o sin una solución de gliadina, confirmando que la correlación entre la expresión de ARNm de  $IFN\gamma$  y  $V\alpha 24$  mRNA se mantenía también tras la estimulación con gliadina (Spearman  $r = 0.5164$ ,  $p < 0.05$ ) (figura 15E).

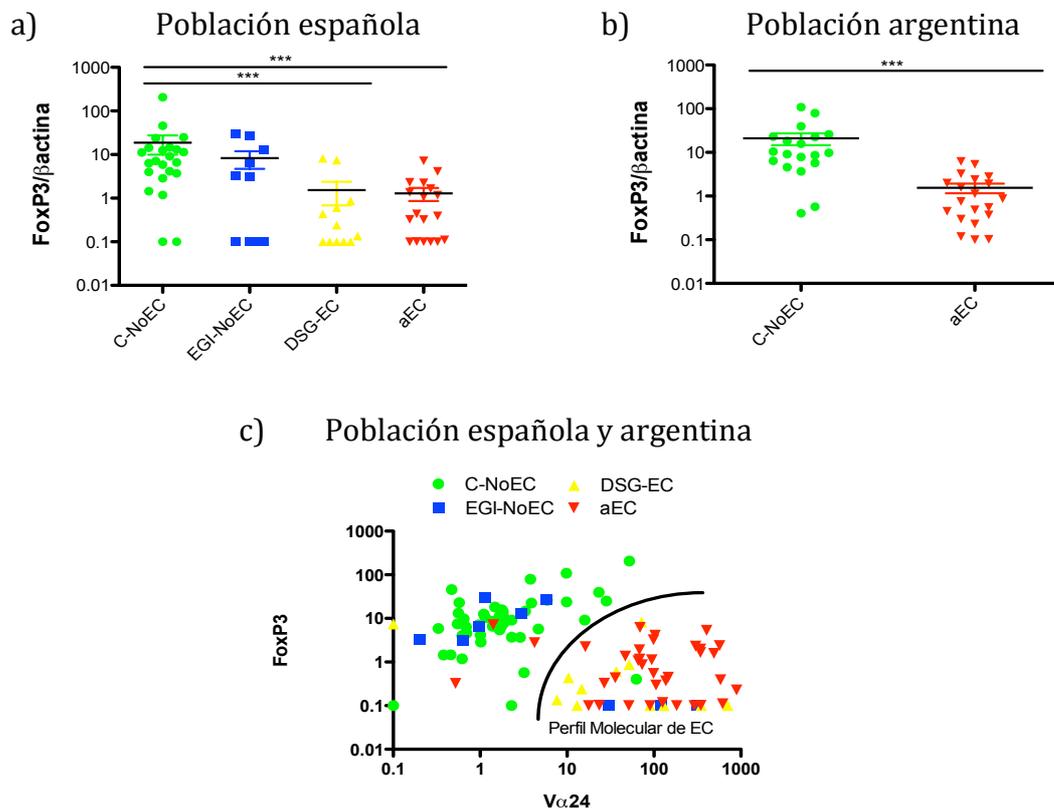


**Figura 15: La expresión duodenal de Vα24 se correlaciona con IFNγ tanto en condiciones basales como tras el cultivo con gliadina de biopsias de pacientes celíacos en DSG.** (A) Niveles de expresión de ARNm de IFNγ mRNA en biopsias duodenales, expresado como el ratio IFNγ/βactina en unidades arbitrarias (U), en aEC, GFD-EC, EGI-NoEC y C-NoEC en la población española y (B) aEC y C-NoEC en la población argentina. Se muestran las diferencias estadísticas (Mann-Whitney U test). Las barras horizontales es la mediana y el RIQ. (C) Correlación entre la expresión de ARNm de IFNγ y Vα24, en unidades arbitrarias (U) en la población española (C-NoEC: Spearman  $r=0.3115$ ,  $p$  valor=n.s.; EGI-NoEC: Spearman  $r=0.4265$ ,  $p$  valor=n.s.; DSG-EC: Spearman  $r=0.5393$ ,  $p$  valor<0.05; aEC: Spearman  $r=0.4323$ ,  $p$  valor<0.05) y (D) la población argentina (C-NoEC: Spearman  $r=0.5895$ ,  $p$  valor<0.05; aEC: Spearman  $r=0.6917$ ,  $p$  valor<0.001). (E) Correlación entre el incremento ( $\Delta$ ) en la expresión de IFNγ y Vα24, en unidades arbitrarias (U) después del cultivo de 8 biopsias de pacientes en DSG ( $p<0.05$ ). Los datos de esta gráfica han sido obtenidos en colaboración con el Dr. David Bernardo, actualmente en el Imperial College, Londres.

## 5.- RESULTADOS

### 5.2C. La expresión de ARNm de $V\alpha 24$ y FoxP3 en el duodeno revelan un perfil molecular propio de enfermedad celíaca.

Después, investigamos los niveles de expresión de ARNm de FoxP3 en el duodeno como una forma indirecta de cuantificar las células Treg de la mucosa. Los pacientes celíacos (aEC,  $p < 0.001$ ; DSG-EC,  $p < 0.001$ ) presentaron una disminución de la expresión de ARNm de FoxP3 comparado con los controles (C-NoEC) (figura 16A). Los mismos resultados fueron encontrados en un segundo análisis independiente en la población argentina ( $p < 0.001$ ) (figura 16B). Por todo ello, la mucosa duodenal se podría caracterizar desde el punto de vista molecular por un incremento de la expresión de ARNm de  $V\alpha 24$  (figuras 14A y B) y una disminución de la expresión de FoxP3 (figuras 16A y B), mostrando un perfil molecular propio de la EC.



**Figura 16: Los niveles de expresión de ARNm de  $V\alpha 24$  y FoxP3 muestran un perfil molecular propio de la enfermedad celíaca.** (A) Niveles de expresión de ARNm de FoxP3 en biopsias duodenales, mostrado como el ratio FoxP3/ $\beta$ actina, en unidades arbitrarias (U) en aEC, DSG-EC, EGI-NoEC y C-NoEC en la población española y (B) en aEC y C-NoEC de la población argentina. En las gráficas se muestran las diferencias estadísticamente significativas (prueba no paramétrica U de Mann-Whitney). Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados significativos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ). Las barras horizontales representan la mediana y el RIQ. (C) Perfil molecular duodenal: Correlación entre los niveles de expresión de ARNm de FoxP3 y  $V\alpha 24$  en unidades arbitrarias (U) (C-NoEC: Spearman  $r = 0.3495$ ,  $p < 0.05$ ; EGI-NoEC: Spearman  $r = -0.4577$ ,  $p = n.s$ ; DSG-EC: Spearman  $r = -0.4858$ ,  $p < 0.05$ ; aEC: Spearman  $r = -0.056$ ,  $p = n.s$ ). Los datos de esta gráfica han sido obtenidos en colaboración con el Dr. David Bernardo, actualmente en el Imperial College, Londres.

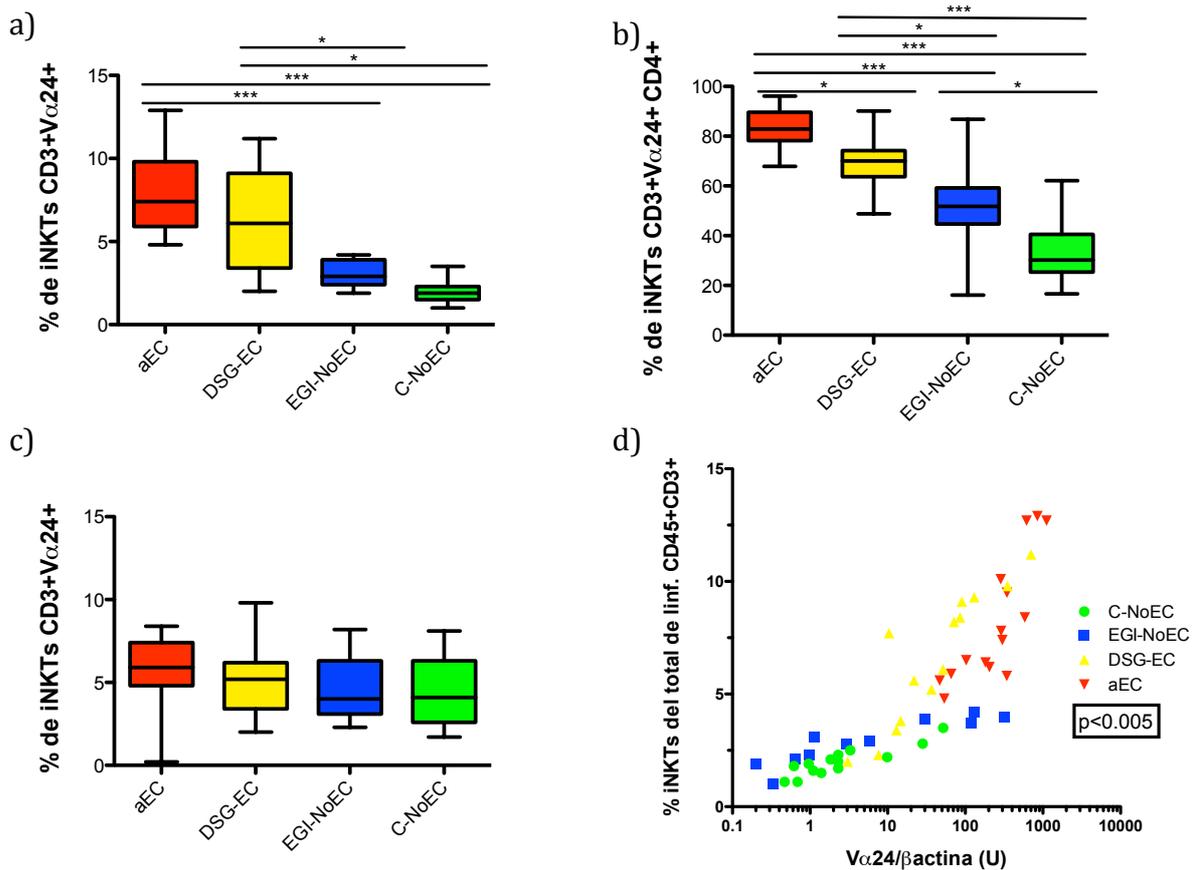
No se encontraron diferencias en los niveles de expresión de ninguna de las moléculas estudiadas en ambas poblaciones (española y argentina), incluidas  $V\alpha 24$  y FoxP3 (datos no mostrados). Por lo tanto, realizamos el análisis conjunto de estas moléculas dentro de los grupos aEC y C-No-EC. Este análisis conjunto de la expresión de ARNm de FoxP3 y  $V\alpha 24$  mRNA nos permitió discriminar entre muestras de pacientes celíacos (aEC y DSG-EC) y pacientes no celíacos (C-NoEC y EGI-NoEC) con una sensibilidad y especificidad del 92%, revelando un perfil molecular propio de la EC (C-NoEC: Spearman  $r=0.3495$ ,  $p<0.05$ ; EGI-NoEC: Spearman  $r=-0.4577$ ,  $p=n.s$ ; DSG-EC: Spearman  $r=-0.4858$ ,  $p<0.05$ ; aEC: Spearman  $r=-0.056$ ,  $p=n.s$ ) (figura 16C).

### **5.2D. Incremento del número de células iNKT intraepiteliales en pacientes celíacos y su correlación con los niveles de expresión de ARNm de $V\alpha 24$ .**

El siguiente paso fue estudiar las células iNKT de los compartimentos intraepitelial y de la LP, mediante citometría de flujo. En consonancia con los hallazgos del incremento de la expresión de ARNm de  $V\alpha 24$  (figuras 14A y B), se encontró un aumento del porcentaje de células iNKT (según caracterización en figura 8B) en el compartimento intraepitelial de pacientes celíacos (tanto aEC, 7.4 RIQ=3.9; como DSG-EC, 6.1 RIQ=5.7) comparado con los grupos control (C-NoEC, 1.9 RIQ=0.8; y EGI-NoEC, 2.9 RIQ=1.5) (figura 17A). También se encontró que estas células iNKT presentaban un fenotipo predominante  $CD4^+$  en los pacientes celíacos (aEC: 82.9 RIQ=11.4, DSG-EC: 70.0 RIQ=10.5, EGI-NoEC: 51.8 RIQ=14.5, C-NoEC: 30.2 RIQ=15.1) (figura 17B). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de células iNKT de la LP en los diferentes grupos de pacientes (figura 17C).

Por último, se estudió si el incremento de la expresión de ARNm de  $V\alpha 24$  (figura 14A) puede ser usado como marcador del incremento del número de células iNKT intraepiteliales encontrado mediante citometría de flujo (figura 17A). Como se muestra en la figura 17D, el porcentaje de células iNKT se correlaciona con los niveles de expresión de  $V\alpha 24$  (C-NoEC: Spearman  $r=0.8603$ ,  $p<0.001$ ; EGI-NoEC: Spearman  $r=-0.9455$ ,  $p<0.001$ ; DSG-EC: Spearman  $r=-0.9297$ ,  $p<0.001$ ; aEC: Spearman  $r=0.8287$ ,  $p=0.001$ ), confirmando nuestros hallazgos y confirmando que el estudio de los niveles de expresión de  $V\alpha 24$  es un planteamiento válido para caracterizar la densidad de células iNKT en tejidos complejos.

## 5.- RESULTADOS



**Figura 17: El incremento de iNKTs intraepiteliales en pacientes celíacos se correlaciona con el aumento de expresión de ARNm de Vα24.** (A) Porcentaje de iNKTs del total de linfocitos T en pacientes aEC, DSG-EC, EGI-NoEC y C-NoEC (B) Porcentaje de células iNKT CD4<sup>+</sup> intraepiteliales del total de células iNKT en aEC, DSG-EC, EGI-NoEC y C-NoEC (C) Porcentaje de células iNKT respecto al total de linfocitos T de la lamina propia en pacientes aEC, DSG-EC, EGI-NoEC y C-NoEC. Las barras horizontales son las medianas, valor máximo, valor mínimo y los percentiles 25% y 75%. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran en las gráficas (prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, p<0.05) (\*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001). (D) Correlación entre la expresión de ARNm de Vα24, en unidades arbitrarias (U) y el porcentaje de células iNKT intraepiteliales respecto al total de linfocitos T en pacientes aEC, DSG-EC, EGI-NoEC y C-NoEC (C-NoEC: Spearman r=0.8603, p<0.001; EGI-NoEC: Spearman r=-0.9455, p<0.001; DSG-EC: Spearman r=-0.9297, p<0.001; aEC: Spearman r=0.8287, p=0.001).

### 5.3. Aumento de la población de células NK-like intraepiteliales en la mucosa intestinal afectada por la enfermedad de Crohn.

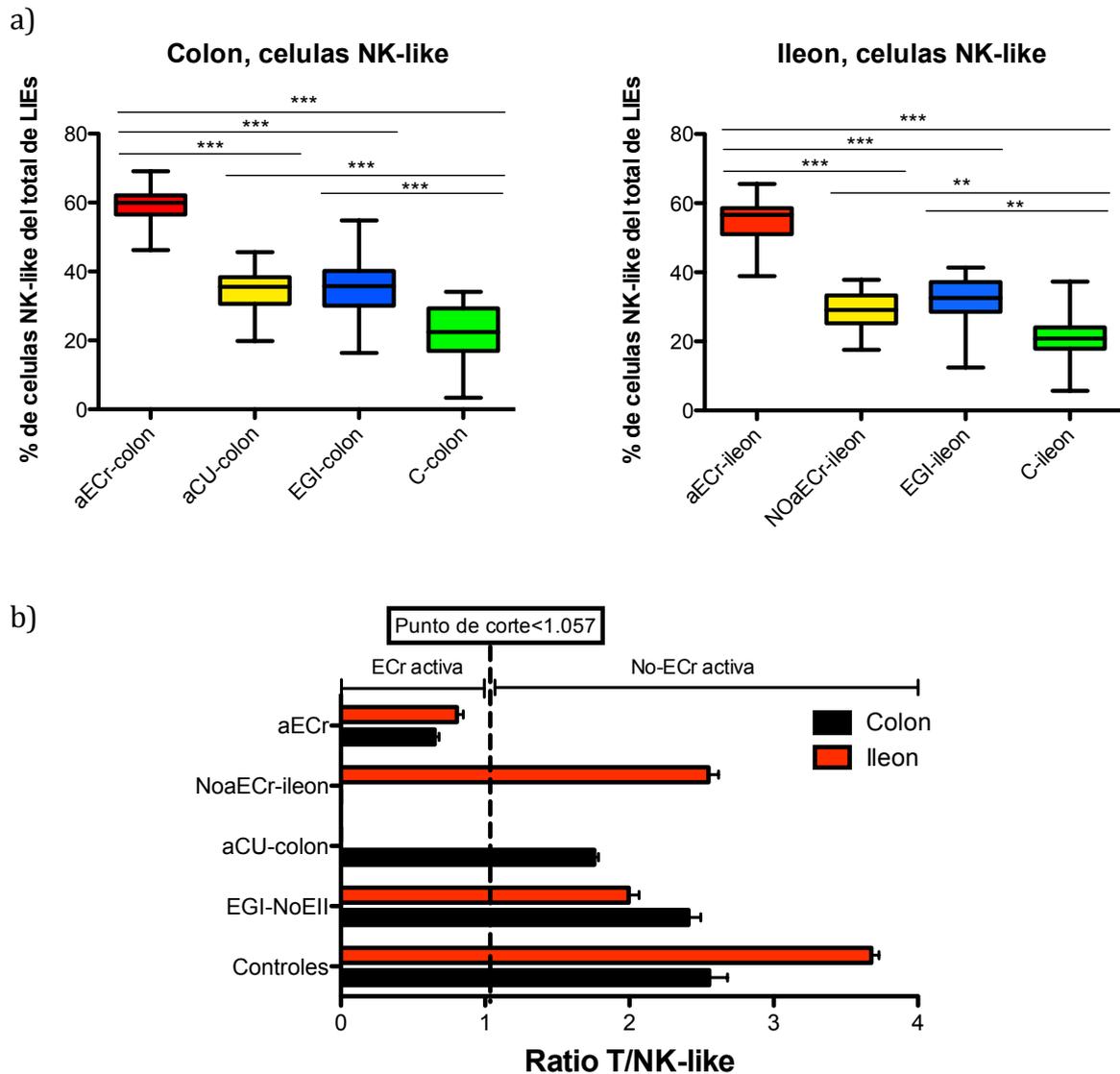
Se incluyeron muestras de biopsias de 178 pacientes (rango de edad: 26-87 años, media de edad: 54.20, 54.74% varones): biopsias de colon afectadas por CU (aCU-colon, n=30), biopsias de colon afectadas con ECr (aECr-colon, n=30), biopsias de íleon con lesión característica de ECr (aECr-íleon, n=15), y biopsias de íleon sin afectación por ECr en pacientes con aECr colónica (NoaECr-íleon, n=15). En aquellos pacientes que presentaban algún tipo de inflamación intestinal en el colon o en el íleon, donde se

descartó EII se recogieron muestras de íleon (EGI-íleon, n=14) o de colon (EGI-colon, n=34) dependiendo de la zona intestinal afectada. Como controles se utilizaron 12 biopsias de íleon y 28 biopsias de colon (C-íleon, n=12 y C-colon, n=28).

Los resultados de la citometría de flujo han sido expresados como porcentajes y analizados mediante la prueba no-paramétrica U de Mann-Whitney. Se consideran estadísticamente significativos valores de  $P < 0.05$  (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ), y se utilizaron como descriptivos estadísticos para cada una de las subpoblaciones de LIE la mediana de todos los porcentajes de las muestras analizadas con el rango intercuartil (RIQ). Para establecer el punto de corte o valor de referencia se calculó la curva ROC (Receiver Operating Characteristic curve analysis) para una sensibilidad del 97% y una especificidad del 92%.

Al analizar los LIE de estos pacientes, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos estudiados para las subpoblaciones de linfocitos TCR $\gamma\delta$ , linfocitos T CD4 o CD8 (datos no mostrados). Sin embargo, nuestros resultados mostraron que la mucosa afectada por ECr, independientemente de si se trataba de una muestra de colon (59.44 RIQ=5.56) o de íleon (56.62 RIQ=7.54), presentaban un gran aumento de la población de células NK-like, al compararlo con el resto de grupos (figura 18A). También se observó un aumento de esta población en los grupos aCU-colon (35.58 RIQ=7.75), EGI-colon (35.78 RIQ=10.05), NoaECr-íleon (29.10 RIQ=8.06) y EGI-íleon (32.55 RIQ=8.61) al compararlo con los controles sanos (C-colon: 22.46 RIQ=12.35, C-íleon: 20.86 RIQ=6.15). Sin embargo, este aumento es mucho menor que aquel que se produce en la mucosa afectada por ECr, lo cual nos permite el diagnóstico diferencial entre la ECr y el resto de patologías intestinales (figura 18A). No se encontraron diferencias significativas entre las muestras de aCU-colon y de EGI-colon en el colon, o entre las muestras de NoaEcCr-íleon y EGI-íleon (figura 18A). Dado que la población de células NK-like es complementaria a la población de linfocitos T (juntas suman el 100% de los LIEs), se estableció un ratio entre estas 2 poblaciones (ratio T/NK-like), donde se observa claramente la diferencia entre las zonas afectadas por ECr y las que no. Mediante curva ROC se estableció un punto de corte de 1.057. Valores del ratio por debajo de este punto de corte mostraron afectación por ECr, independientemente del tramo intestinal estudiado (figura 18B).

## 5.- RESULTADOS

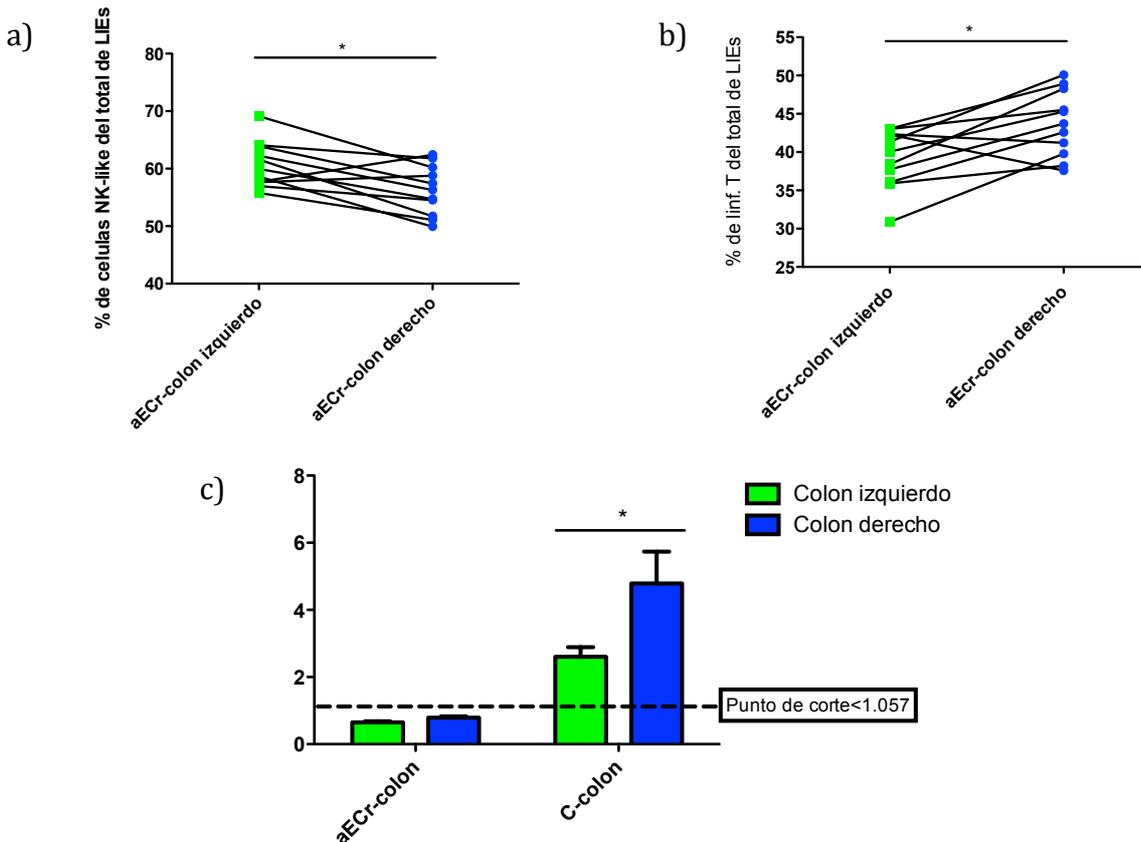


**Figura 18: Aumento de células NK-like intraepiteliales en la mucosa intestinal afectada por enfermedad de Crohn.** (A) Porcentaje de células NK-like ( $CD103^+CD45^+CD3^+$ ) respecto al total de LIE en pacientes con afectación de colon por ECr (aECr-colon), afectación de colon por CU (aCU-colon), afectación de colon por otra patología inflamatoria (EGI-colon), pacientes control sin afectación colónica (C-colon), pacientes con afectación de íleon por ECr (aECr-íleon), pacientes con ECr colónica pero sin afectación del íleon (NoaECr-íleon), pacientes con íleon inflamado por otras causas (EGI-NoEC) y pacientes control sin afectación en el íleon (C-íleon). Las barras horizontales son las medianas, valor máximo, valor mínimo y los percentiles 25% y 75%. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran en las gráficas (prueba no paramétrica U de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ) (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ). (B) Ratio entre linfocitos T y células NK-like en todos los grupos de pacientes estudiados. Punto de corte establecido mediante curva ROC. Barras verticales, ratio medio entre todas las muestras de un grupo de pacientes y error estándar de la media. Punto de corte calculado mediante curva ROC para una sensibilidad del 97% y una especificidad del 92%.

Sin embargo, en estos experimentos no se distinguió entre muestras provenientes de colon derecho o de colon izquierdo. Según resultados previos presentados en esta

tesis, existen diferencias en el porcentaje de linfocitos T y de células NK-like del compartimento intraepitelial entre ambos tramos intestinales. Por ello realizamos un nuevo ensayo con biopsias de colon provenientes de pacientes con ECr activa (n=11, rango de edad: 39-65, media de edad: 51, 38.5% varones), donde se diagnosticó afectación mucosa mediante estudio anatomopatológico. A cada paciente se le extrajo un explante de colon derecho y otro explante de colon izquierdo, ambos con afectación mucosa por aECr. En ambos explantes se estudió la población de linfocitos T y de células NK-like intraepiteliales. Los resultados de la citometría de flujo han sido expresados como porcentajes y analizados mediante la prueba *t de student* pareada. Valores de  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ). Como descriptivos estadísticos para cada una de las subpoblaciones de LIEs se han utilizado la media de todos los porcentajes de las muestras analizadas con el error estándar de la media (EEM).

aECr, células NK-like, colon izquierdo vs colon derecho      aECr, linfocitos T, colon izquierdo vs colon derecho



**Figura 19: Mayor porcentaje de células NK-like intraepiteliales en el colon izquierdo que en el colon derecho ambos afectados por enfermedad de Crohn.** Dentro de los LIE se estudiaron las poblaciones de (A) células NK-like ( $CD3^-$ ) y (B) linfocitos T ( $CD3^+T\alpha\beta^+$ ). Se aplicó la prueba *t de student* y los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados significativos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ). (C) Ratio T/NK-like en muestras de colon derecho e izquierdo afectadas por ECr o de pacientes control sin afectación colónica. Barras horizontales, ratio medio y error estándar de la media.

## 5.- RESULTADOS

Los resultados obtenidos muestran que el colon izquierdo afectado por ECr ( $60.70 \pm 1.19$ ) presenta un mayor porcentaje de células NK-like en comparación con el colon derecho ( $56.25 \pm 1.29$ ) (figura 19A). Así mismo, el colon derecho ( $43.75 \pm 1.29$ ) presenta un mayor porcentaje de linfocitos T en comparación con el colon izquierdo ( $39.20 \pm 1.15$ ) (figura 19B). Sin embargo, al realizar el ratio T/NK-like en todos los pacientes, todos los valores resultantes se encuentran por debajo del punto de corte establecido mediante curva ROC en el apartado anterior. Este mismo ratio fue aplicado a las muestras de colon derecho y colon izquierdo de pacientes sanos, resultando en que todos los pacientes estudiados presentaban un ratio T/NK-like por encima del punto de corte (figura 19C).

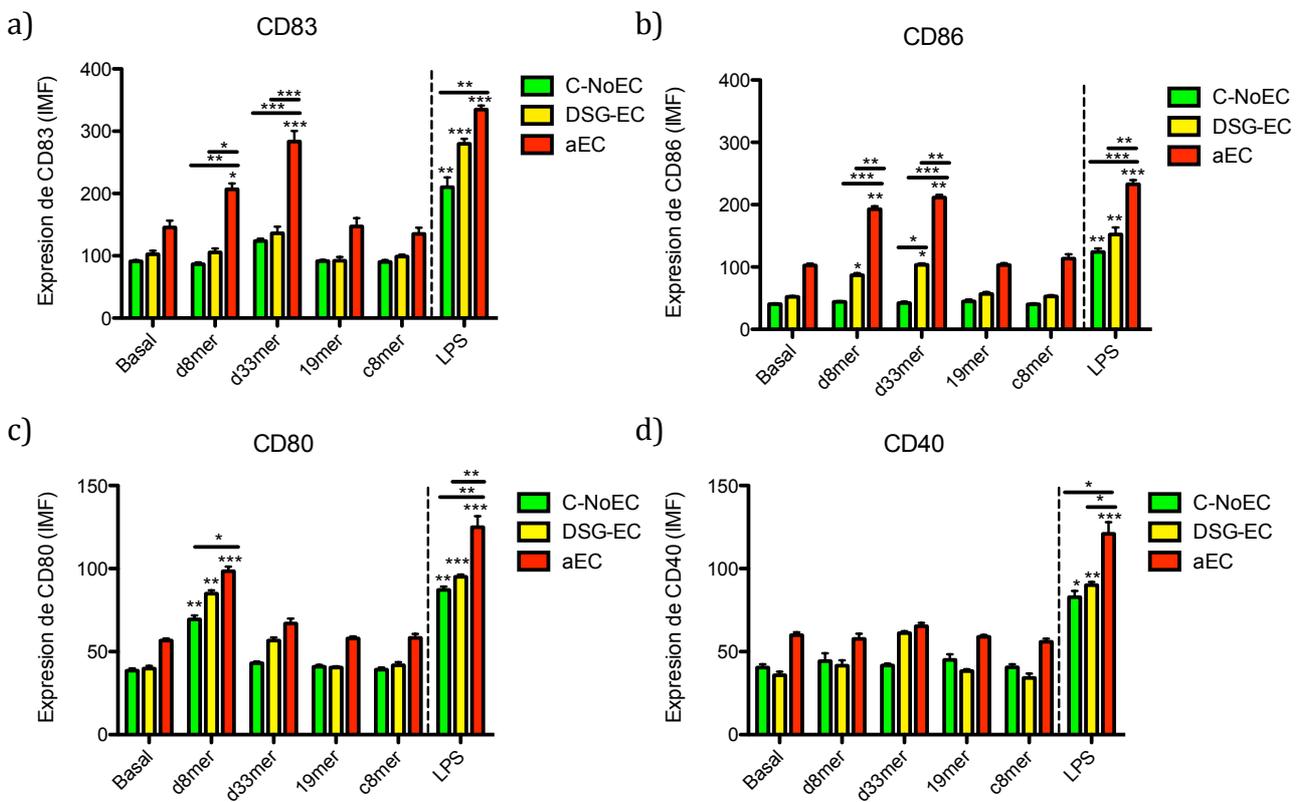
### 5.4. Estudio del efecto inmunogénico del péptido derivado de la gliadina 8mer en un modelo de células dendríticas de sangre periférica y linfoproliferativo autólogo.

Para el estudio del efecto inmunogénico de la forma desaminada del péptido 8mer derivado de la gliadina 8mer, se utilizaron CD y linfocitos T obtenidos a partir de CMSP de un total de 24 individuos (rango de edad: 18-56 años, media de edad: 28 años, 82% varones): 8 voluntarios sanos que no presentaban enfermedades inflamatorias, ni enfermedades autoinmunes, ni alergias, ni ningún tipo de patología sistémica (C-NoEC, n=8), 8 pacientes celíacos en DSG (DSG-EC, n=8) y 8 pacientes celíacos en actividad (aEC, n=8).

En los ensayos de detección de moléculas de maduración y activación de CD por citometría de flujo, los datos fueron representados como la intensidad media de fluorescencia (IMF), con la media y el EEM. Los datos del linfoproliferativo fueron representados como la media de los porcentajes obtenidos y EEM. Los datos del análisis molecular fueron normalizados con la molécula *housekeeping* GADPH y representados en unidades arbitrarias (U). Para comparar los datos en conjunto se aplicó la prueba ANOVA y la corrección de Bonferroni. Para la comparación entre basal/parámetro y entre los grupos dentro de un mismo parámetro se utilizó la prueba *t de student* no pareada. Valores de  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ). Los resultados de los análisis estadísticos se muestran en las figuras y se detallan en los pies de figura.

5.4A. El péptido desaminado 8mer produce activación de las células dendríticas *in vitro*.

Para este ensayo se utilizaron células dendríticas estimuladas con LPS como control positivo. En todos los grupos de pacientes, el LPS produjo un aumento estadísticamente significativo de las moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 y CD86, induciendo la activación de las células dendríticas respecto a los basales de cada grupo de pacientes. También produjo la maduración terminal de las células dendríticas representado por el aumento de la molécula CD83 en comparación con cada uno de los basales.



**Figura 20: Aumento de la expresión de CD83, CD86 y CD80 en células dendríticas cultivadas con el péptido 8mer desaminado de gliadina.** Expresión de las moléculas (A) CD83, (B) CD86, (C) CD80 y (D) CD40 en la superficie de células dendríticas obtenidas de pacientes celíacos activos (aEC), celíacos en DSG (DSG-EC) y controles no celíacos (C-NoEC), cultivadas con los péptidos derivados de la gliadina 8mer desaminado, 33mer desaminado y 19 mer, y con el péptido control modificado del 8mer (c8mer), y analizadas mediante citometría de flujo. Los resultados fueron expresados en Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) y fueron analizados en conjunto mediante el test ANOVA y la corrección de Bonferroni para aquellos que resultaran significativos. Se comparó cada uno de los grupos de pacientes con su correspondiente basal y dentro de cada uno de los péptidos utilizados, se compararon los diferentes grupos de pacientes. Para ello se utilizó la prueba *t de student* no pareada. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron significativos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ). Las barras horizontales representa el valor medio y el EEM de cada grupo. Como control positivo se utilizaron CD de cada grupo de pacientes estimuladas con LPS y como basal CD de cada grupo de pacientes en cultivo sin ningún estímulo.

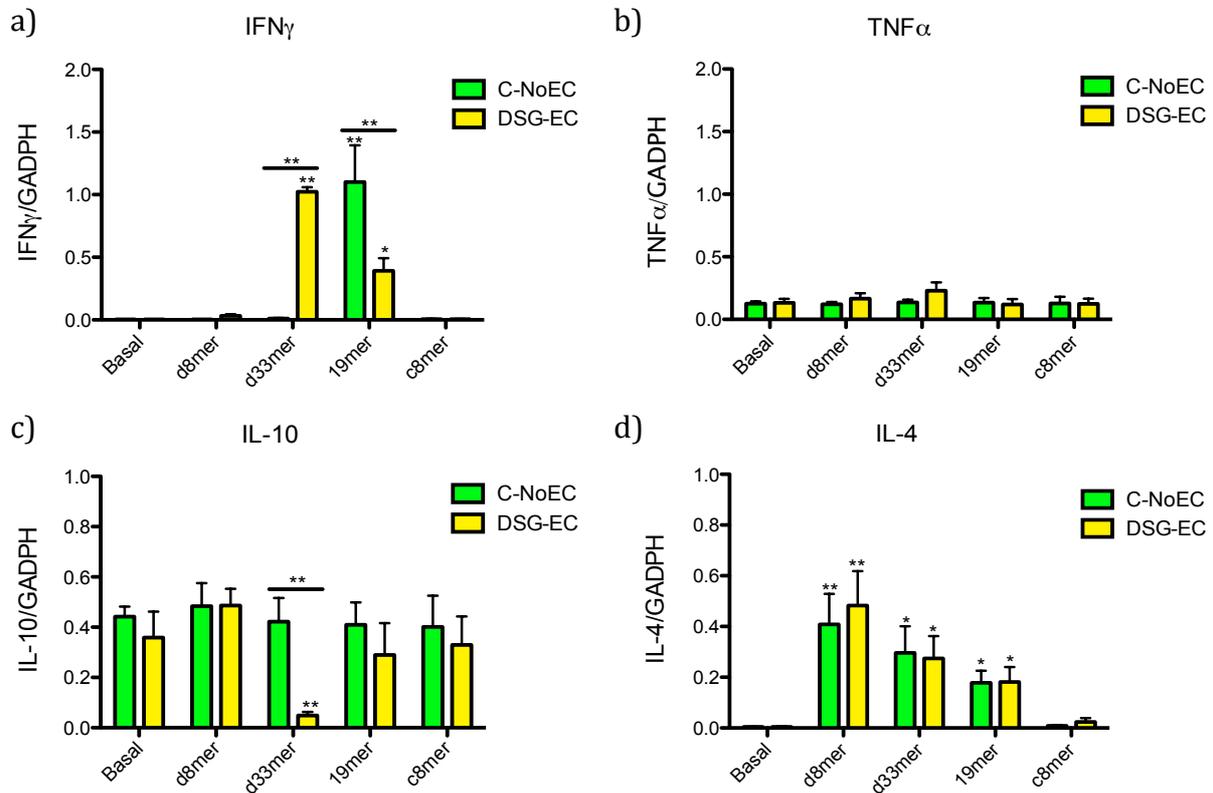
## 5.- RESULTADOS

Las células dendríticas estimuladas con el péptido d8mer mostraron un aumento estadísticamente significativo de las moléculas CD80 (aEC,  $p < 0.001$ , DSG-EC,  $p < 0.01$ ) (figura 20C) y CD86 (aEC,  $p < 0.01$ , DSG-EC,  $p < 0.05$ ) (figura 20B) en los pacientes celíacos y también de CD80 en los pacientes no celíacos (C-NoEC,  $p < 0.01$ ) (figura 20C), en comparación con sus respectivos basales sin estimular, siendo mayor y estadísticamente significativo en los pacientes aEC en las tres moléculas descritas. Las células dendríticas estimuladas con el péptido d33mer mostraron un aumento estadísticamente significativo de las moléculas CD83 en pacientes aEC ( $p < 0.001$ ) (figura 20A) y de CD86 en aEC ( $p < 0.01$ ) y DSG-EC ( $p < 0.05$ ) (figura 20B) en comparación con sus respectivos basales. Los otros péptidos utilizados, el 19mer y el c8mer, no produjeron ningún cambio en la expresión de los marcadores de activación/maduración de las células dendríticas cultivadas con ellos.

### 5.4B. El péptido desaminado 8mer induce *in vitro* un perfil de producción de citocinas pro-inflamatorio en las células dendríticas.

La maduración de las CD está asociada normalmente con la síntesis de un determinado perfil de citocinas. Debido a esto, decidimos estudiar el perfil de producción de citocinas de las CD de pacientes DSG-EC y C-NoEC mediante la expresión de ARNm. Nuestros resultados revelaron que la CD estimuladas con el péptido d8mer no presentaban un aumento de la expresión de ARNm ni de IFN $\gamma$  (figura 21A) ni de TNF $\alpha$  (figura 21B), en comparación con los basales, este último directamente relacionado con la ausencia de incremento de la expresión de CD40 en células dendríticas estimuladas con el péptido (figura 20D). Sin embargo, el péptido 19mer produjo un aumento en la expresión de ARNm de IFN $\gamma$  en pacientes C-NoEC ( $p < 0.01$ ) y pacientes DSG-EC ( $p < 0.05$ ), en comparación con sus respectivos basales, siendo mayor en los pacientes no celíacos (figura 21A). El péptido 33mer sólo produjo un aumento de la expresión de ARNm de IFN $\gamma$  en los pacientes DSG-EC, en comparación con el basal ( $p < 0.01$ ). Únicamente las CD de pacientes DSG-EC estimuladas con el péptido d33mer mostraron una disminución estadísticamente significativa de la expresión de ARNm de IL-10 ( $p < 0.01$ ), en comparación con el basal, no produciéndose en los pacientes C-NoEC (figura 21C). La expresión de ARNm de IL-4 se vió incrementada en las CD de pacientes tanto aEC como DSG-EC al ser

estimuladas con los péptidos d8mer (C-NoEC,  $p < 0.01$ ; DSG-EC,  $p < 0.01$ ), 33mer (C-NoEC,  $p < 0.05$ ; DSG-EC,  $p < 0.05$ ) y 19mer (C-NoEC,  $p < 0.05$ ; DSG-EC,  $p < 0.05$ ), en comparación con sus respectivos basales, siendo mayor el incremento de IL-4 inducido por el péptido d8mer (figura 21D).

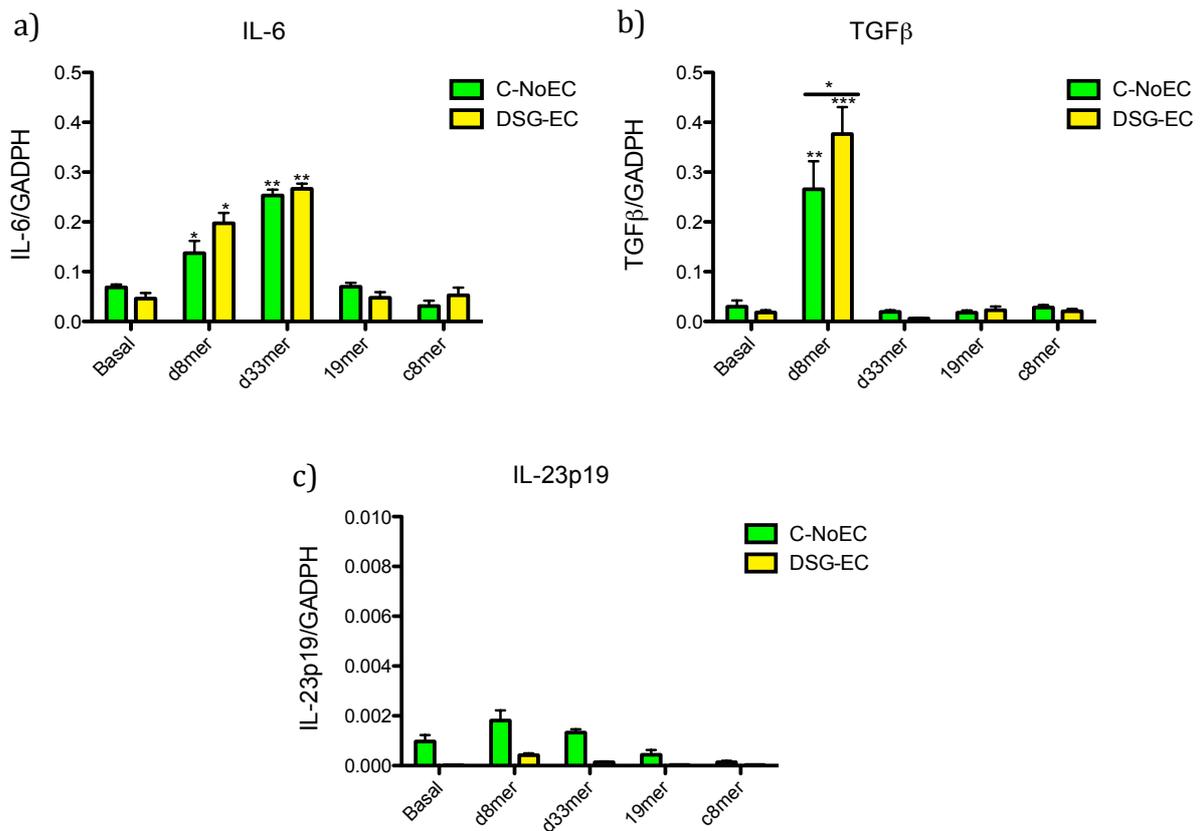


**Figura 21: Aumento de los niveles de expresión de ARNm de IL-4 en células dendríticas cultivadas con el péptido desaminado 8mer.** Niveles de expresión de ARNm en células dendríticas de pacientes control no celíacos (C-NoEC) y pacientes celíacos en dieta sin gluten (DSG-EC), cultivadas con los péptidos d8mer, d33mer, 19mer y c8mer, analizado mediante qPCR y mostrado como el ratio molécula/GADPH. (A) Niveles de expresión de ARNm de IFN $\gamma$ . (B) Niveles de expresión de ARNm de TNF $\alpha$ . (C) Niveles de expresión de ARNm de IL-10. (D) Niveles de expresión de ARNm de IL-4. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias (U) y fueron analizados en conjunto mediante la prueba ANOVA y la corrección de Bonferroni para aquellos que resultaran significativos. Se comparó cada uno de los grupos de pacientes con su correspondiente basal y dentro de cada uno de los péptidos utilizados, se compararon los diferentes grupos de pacientes. Para ello se utilizó la prueba *t de student* no pareada. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron significativos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ). Las barras horizontales representa el valor medio y el EEM de cada grupo. Como basal se utilizaron CD de cada grupo de pacientes, en cultivo sin ningún estímulo.

Tanto el péptido d8mer (C-NoEC,  $p < 0.05$ ; DSG-EC,  $p < 0.05$ ) como el péptido d33mer (C-NoEC,  $p < 0.01$ ; DSG-EC,  $p < 0.01$ ) produjeron un incremento estadísticamente significativo de la expresión de ARNm de IL-6, en comparación con sus respectivos basales (figura 22A). Sin embargo, sólo el péptido d8mer indujo un incremento de TGF $\beta$  (ambas, citocinas inductoras de células Th17) tanto en pacientes C-NoEC ( $p < 0.01$ ) como en pacientes DSG-EC ( $p < 0.001$ ) (figura 22B), en comparación

## 5.- RESULTADOS

con sus respectivos basales, siendo mayor este incremento en los pacientes DSG-EC. Respecto a la expresión de ARNm de IL23p19 (citocina mantenedora de la respuesta Th17), ninguno de los péptidos estudiados produjeron cambios respecto a los niveles basales en las CD cultivadas tanto de pacientes C-NoEC como de pacientes DSG-EC (figura 22C).



**Figura 22: Aumento de los niveles de expresión de ARNm de IL-6 y TGFβ en células dendríticas cultivadas con el péptido 8mer desaminado.** Niveles de expresión de ARNm en células dendríticas de pacientes control no celíacos (C-NoEC) y pacientes celíacos en dieta sin gluten (DSG-EC), cultivadas con d8mer, d33mer, 19mer y c8mer, analizado mediante qPCR y mostrado como el ratio molécula/GADPH. (A) Niveles de expresión de ARNm de IL-6. (B) Niveles de expresión de ARNm de TGFβ. (C) Niveles de expresión de ARNm de IL-23p19. Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias (U) y fueron analizados en conjunto mediante la prueba ANOVA y la corrección de Bonferroni para aquellos que resultaran significativos. Se comparó cada uno de los grupos de pacientes con su correspondiente basal y dentro de cada uno de los péptidos utilizados, se compararon los diferentes grupos de pacientes. Para ello se utilizó la prueba *t de student* no pareada. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron significativos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ). Las barras horizontales representan el valor medio y el EEM de cada grupo. Como basal se utilizaron CD de cada grupo de pacientes, en cultivo sin ningún estímulo.

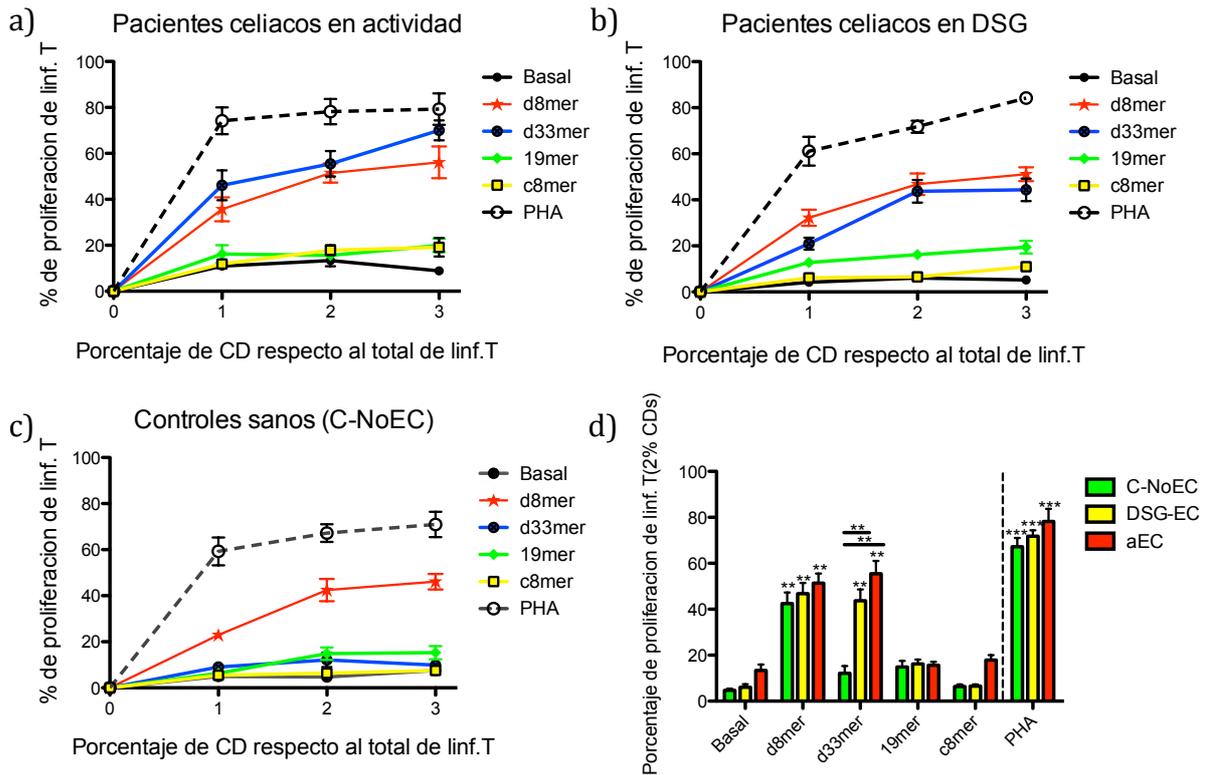
Por todo ello, parece claro que el péptido d8mer es capaz de inducir un perfil de producción de citocinas Th2/Th17 en las CD cultivadas con este péptido, independientemente de si se trata de un paciente celiaco o no. El péptido control c8mer, no produjo variaciones, respecto al cultivo basal, en ninguna de las citocinas estudiadas.

### **5.4C. El péptido desaminado 8mer induce la proliferación de linfocitos T productores de IFN $\gamma$ en ensayos de linfoproliferación autólogos.**

Según nuestros resultados, el péptido d8mer es capaz de inducir la maduración/activación de CD con un perfil de producción de citocinas Th2/Th17 (de acuerdo a la expresión de ARNm) tanto en pacientes celíacos como en controles sanos. Nuestro siguiente paso fue determinar si este péptido es capaz de producir linfoproliferación de linfocitos T productores de IFN $\gamma$  en un cultivo de CD estimuladas con el péptido y linfocitos vírgenes del mismo paciente.

Como control positivo se utilizó el mitógeno PHA que indujo una gran linfoproliferación en los tres grupos de pacientes en comparación con el basal sin estimular (C-NoEC, DSG-EC y aEC) (figuras 23A, B y C) siendo linfocitos T productores de IFN $\gamma$  (figura 24). Los péptidos 19mer y c8mer no produjeron linfoproliferación en ninguno de los pacientes estudiados (figuras 23A, B y C). El péptido d33mer fue capaz de inducir una linfoproliferación estadísticamente significativa sólo en los pacientes celíacos DQ2+, en comparación con el cultivo basal, independientemente de si estos pacientes se encontraban tratados con dieta sin gluten ( $p < 0.01$ ) (figura 23B) o en actividad ( $p < 0.01$ ) (figura 23A). Sin embargo, el péptido d8mer fue capaz de inducir una proliferación de linfocitos T estadísticamente significativa en los pacientes celíacos en actividad ( $p < 0.01$ ) (figura 23A), celíacos en dieta sin gluten ( $p < 0.01$ ) (figura 23B) y pacientes control sanos (DQ2-) ( $p < 0.01$ ) (figura 23C) en comparación con sus respectivos basales.

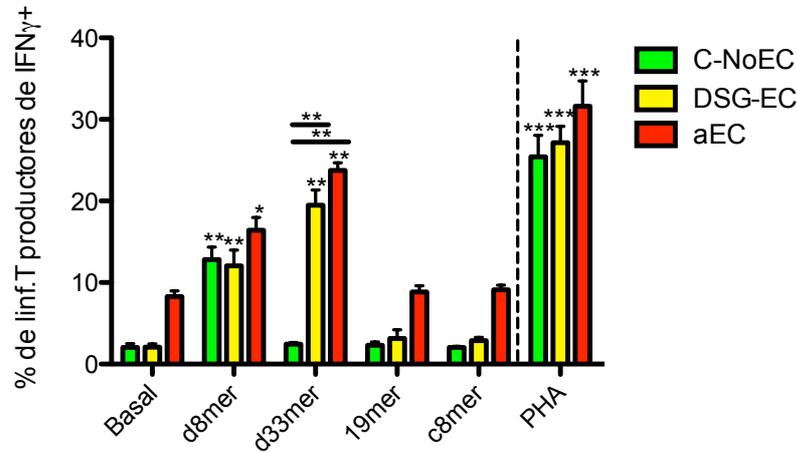
## 5.- RESULTADOS



**Figura 23: El péptido 8mer desaminado induce proliferación de linfocitos T en cultivos autólogos.** Porcentaje de linfocitos T que han proliferado en cocultivo con un 1%, 2% o 3% de células dendríticas autólogas estimuladas con los péptidos d8mer, d33mer, 19mer, c8mer o PHA de (A) pacientes aEC, (B) pacientes EC-DSG y (C) pacientes C-NoEC. (D) Comparación de la linfoproliferación con un 2% de CD estimuladas con los péptidos d8mer, d33mer, 19mer, c8mer y PHA, en los tres grupos de pacientes. Los resultados fueron analizados en conjunto mediante la prueba ANOVA y la corrección de Bonferroni para aquellos que resultaran significativos. Se comparó cada uno de los grupos de pacientes con su correspondiente basal y dentro de cada uno de los péptidos utilizados, se compararon los diferentes grupos de pacientes (prueba *t de student* no pareada). Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron significativos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ). Las barras horizontales representa el valor medio y el EEM de cada grupo. Como basal se utilizaron CD de cada grupo de pacientes, en cultivo sin ningún estímulo.

Además, en los co-cultivos en los que se observó una linfoproliferación estadísticamente significativa respecto al basal producida por el péptido d8mer (en todos los pacientes) (figuras 23A, B y C) y por el péptido d33mer (únicamente en pacientes celíacos) (figuras 23A y B), se produjo un aumento estadísticamente significativo de linfocitos T productores de  $IFN\gamma$  en comparación con sus respectivos basales (d8mer: C-NoEC  $p < 0.01$ , DSG-EC  $p < 0.01$ , aEC  $p < 0.05$ ; d33mer: DSG-EC  $p < 0.01$  y aEC  $p < 0.01$ ), no observándose este aumento en los cultivos con 19mer y c8mer (figura 24). Por todo ello, parece claro que el péptido d8mer es capaz de inducir una respuesta inmunitaria pro-inflamatoria, mediada por linfocitos T productores de

IFN $\gamma$ , independientemente si la presentación antigénica es realizada por CD DQ2+ (pacientes aEC y DSG-EC) o CD DQ2- (pacientes C-NoEC).



**Figura 24: El péptido 8mer desaminado induce la proliferación de linfocitos T productores de IFN $\gamma$ .** Porcentaje de linfocitos T productores de IFN $\gamma$  que han proliferado en un cocultivo con un 2% de células dendríticas autólogas estimuladas con los péptidos d8mer, d33mer, 19mer, c8mer y PHA de pacientes celíacos en actividad (aEC), celíacos en dieta sin gluten (EC-DSG), y controles no celíacos (C-NoEC). Los resultados fueron analizados en conjunto mediante la prueba ANOVA y la corrección de Bonferroni para aquellos que resultaran significativos. Se comparó cada uno de los grupos de pacientes con su correspondiente basal y dentro de cada uno de los péptidos utilizados, se compararon los diferentes grupos de pacientes (prueba *t de student* no pareada). Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron significativos (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ). Las barras horizontales representa el valor medio y el EEM de cada grupo. Como basal se utilizaron CD de cada grupo de pacientes, en cultivo sin ningún estímulo.

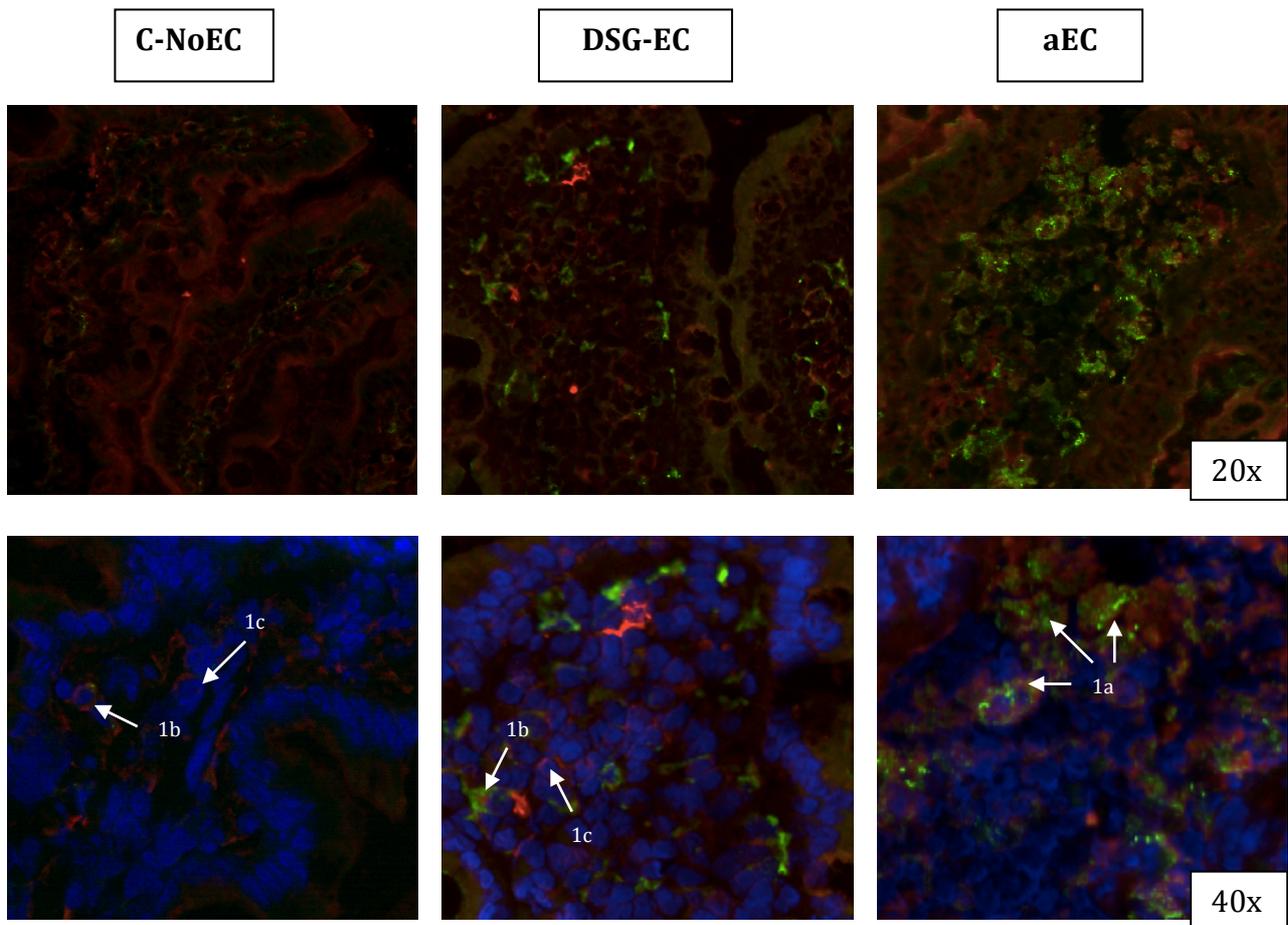
### 5.5. Modulación de la respuesta inmunitaria inducida por el gluten en la enfermedad celíaca mediante la glicosilación del péptido 33mer desaminado.

#### 5.5A. Aumento del número de células DC-SIGN<sup>+</sup> en la lamina propia de pacientes celíacos en actividad.

Los CLRs, en especial DC-SIGN, están implicados en los fenómenos de diferenciación, reprogramación y expresión de determinados genes codificantes de citocinas, que condicionan el fenotipo y la actividad final de las CD (García-Vallejo and van Kooyk, 2009). Por todo ello, nos planteamos el estudio de este receptor en la mucosa duodenal. Para ello realizamos tinciones de inmunofluorescencia en cortes histológicos provenientes de 15 pacientes (rango de edad: 11-58 años, media de edad: 18 años, 65.5% varones): pacientes C-NoEC (n=5), pacientes DSG-EC (n=5) y pacientes aEC (n=5), donde estudiamos las moléculas HLA-DR, CD4 y DC-SIGN.

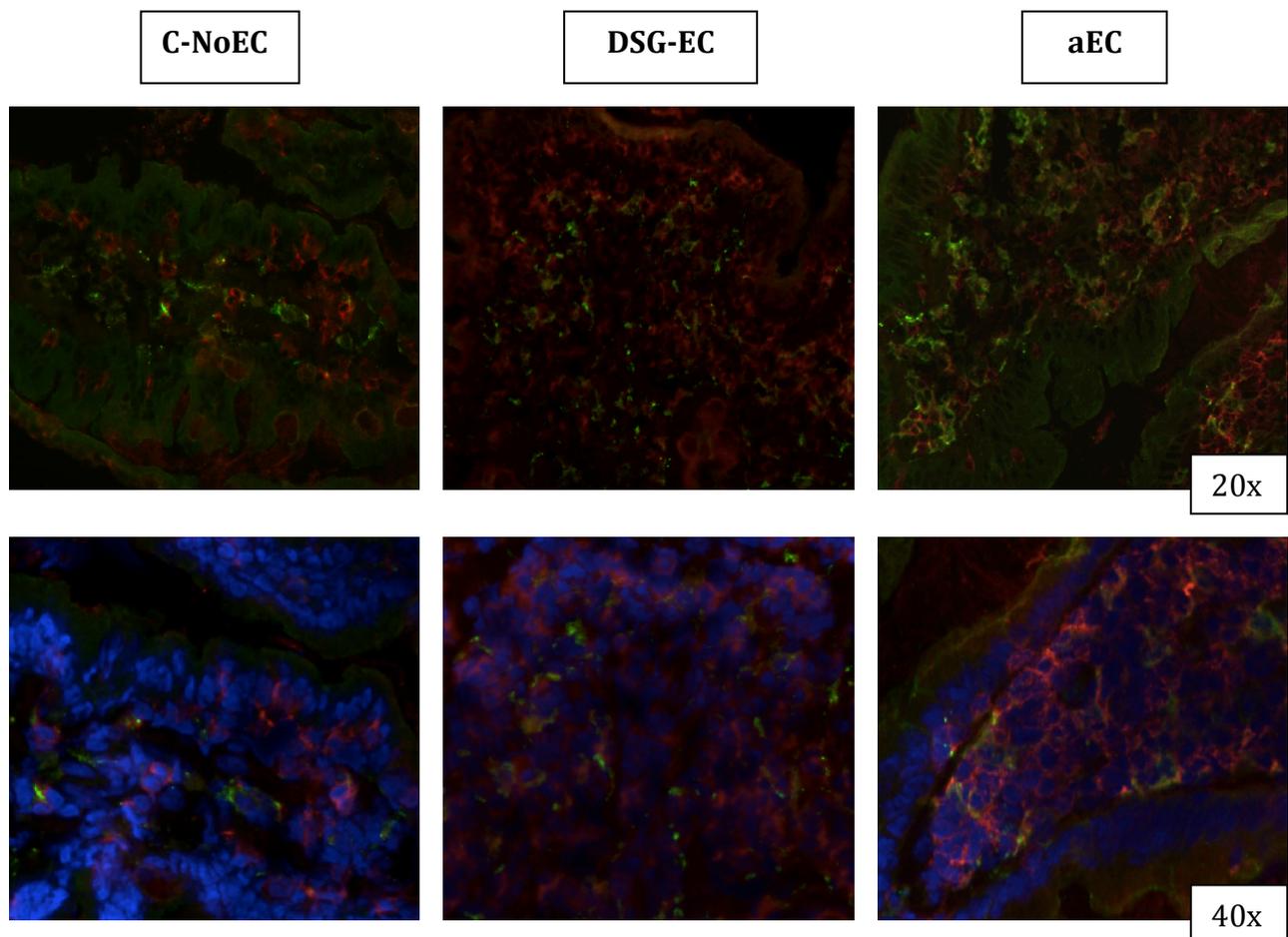
## 5.- RESULTADOS

Los resultados obtenidos mostraron que la expresión de DC-SIGN estaba aumentada en las células de la LP de los pacientes aEC (figura 25). En estos pacientes se observó que todas las células DC-SIGN<sup>+</sup> eran HLA-DR<sup>+</sup> (figura 25-1a). Por el contrario, tanto los pacientes C-NoEC como los pacientes celíacos en dieta sin gluten (DSG-EC) mostraron un menor número de células DC-SIGN/HLA-DR<sup>+</sup> (figura 25-1b). Además, en estos pacientes se encontraron células HLA-DR<sup>+</sup> que no expresaban DC-SIGN (figura 25-1c).



**Figura 25. Aumento de células DC-SIGN/HLA-DR<sup>+</sup> en la lamina propia de pacientes celíacos en actividad.** Ejemplo representativo del análisis por inmunofluorescencia de DC-SIGN (verde) y HLA-DR (rojo) en biopsias duodenales de pacientes celíacos en actividad (aEC), celíacos en dieta sin gluten (DSG-EC) y controles no celíacos sin afectación duodenal (C-NoEC), con marcaje nuclear DAPI en azul.

En la enfermedad celíaca activa se produce una infiltración de linfocitos T  $CD4^+$  tanto en la lamina propia como en el epitelio. Tal y como se muestra en la figura 26, esta infiltración de linfocitos T está acompañada por un aumento del número de células  $DC-SIGN^+$  que son células  $DC-SIGN/HLA-DR^+$  (figura 25-1a). Estos resultados parecen ser específicos de la mucosa duodenal de pacientes celíacos en actividad debido a que en los pacientes C-NoEC no se produce este aumento ni de linfocitos T  $CD4^+$  ni de células  $DC-SIGN^+$  (figura 26). Los pacientes celíacos en dieta sin gluten (DSG-EC) mostraron una leve infiltración de linfocitos T  $CD4^+$  y una menor expresión de  $DC-SIGN$  comparado con los aEC. Estos niveles dependen del tiempo que ha transcurrido desde que se inició la dieta libre de gluten (figura 26).



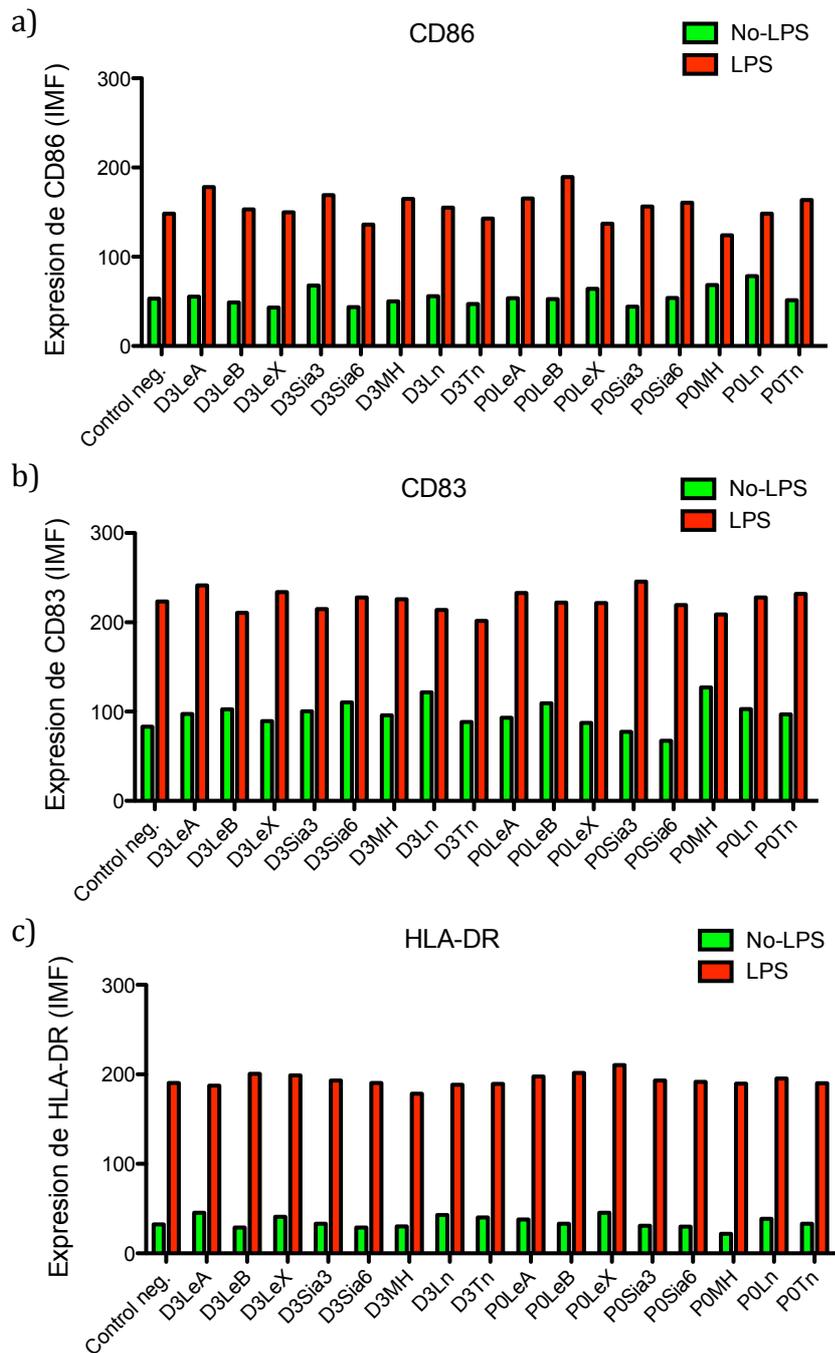
**Figura 26. Aumento de células  $DC-SIGN$  y  $CD4^+$  en la mucosa duodenal de pacientes celíacos en actividad.** Ejemplo representativo del análisis por inmunofluorescencia de  $DC-SIGN$  (verde) y  $CD4$  (rojo) en biopsias duodenales de pacientes celíacos en actividad (aEC), celíacos en dieta sin gluten (DSG-EC) y controles no celíacos sin afectación duodenal (C-NoEC), con marcaje nuclear DAPI en azul.

## 5.- RESULTADOS

### **5.5B. Los diferentes glicopéptidos derivados de la glicosilación del péptido 33mer desaminado no producen maduración ni activación de células dendríticas inmaduras.**

El primer paso para comprobar el efecto que tenían los compuestos glicosilados derivados del péptido d33mer sobre las células dendríticas fue el estudio de las moléculas de maduración/activación CD86, CD83 y HLA-DR, mediante citometría de flujo. Para ello se utilizaron CDmo de sangre periférica de pacientes sanos. Estas CDmo fueron estimuladas con los diferentes glicopéptidos (glicopéptido-dendrímero o glicopéptido sólo). De cada compuesto se hizo un duplicado donde se añadió LPS a concentración 1 µg/ml. Cada una de las condiciones se hace por triplicado y el experimento se repitió en 3 ocasiones diferentes. Los resultados de la citometría de flujo fueron expresados como la media de las IMF de los tres triplicados por condición en los 3 experimentos separados en el tiempo.

Ninguno de los glicopéptidos estudiados indujo cambios en las moléculas CD86, CD83 o HLA-DR, en comparación con el basal (figura 27). Únicamente, al añadir LPS al cultivo, junto con cada uno de los glicopéptidos estudiados, se produjo un aumento de CD86, CD83 y HLA-DR en las células dendríticas. Este aumento se produjo también en el cultivo de células dendríticas basal estimulado con LPS, pero no hubo diferencias con el aumento producido por la acción sinérgica de los glicopéptidos y el LPS (figura 27). Es decir, los glicopéptidos por si solos no fueron capaces de inducir la maduración y activación de las CDmo. Para que la CDi alcance un estado de maduración y activación es necesaria la estimulación de las células dendríticas a través de su TLR (estimulación con LPS).



**Figura 27: Los glicopéptidos derivados del péptido 33mer desaminado no inducen maduración ni activación de las células dendríticas.** Expresión de las moléculas (A) CD86, (B) CD83 y (C) HLA-DR en células dendríticas derivadas de monocitos de pacientes sanos, medida por citometría de flujo. Los resultados de las tres repeticiones por condición y de los 3 experimentos independientes han sido expresados como la media de todas las intensidades medias de fluorescencia para cada condición dentro de cada molécula. Como control negativo se utilizaron células dendríticas sin estimular o estimuladas únicamente con LPS.

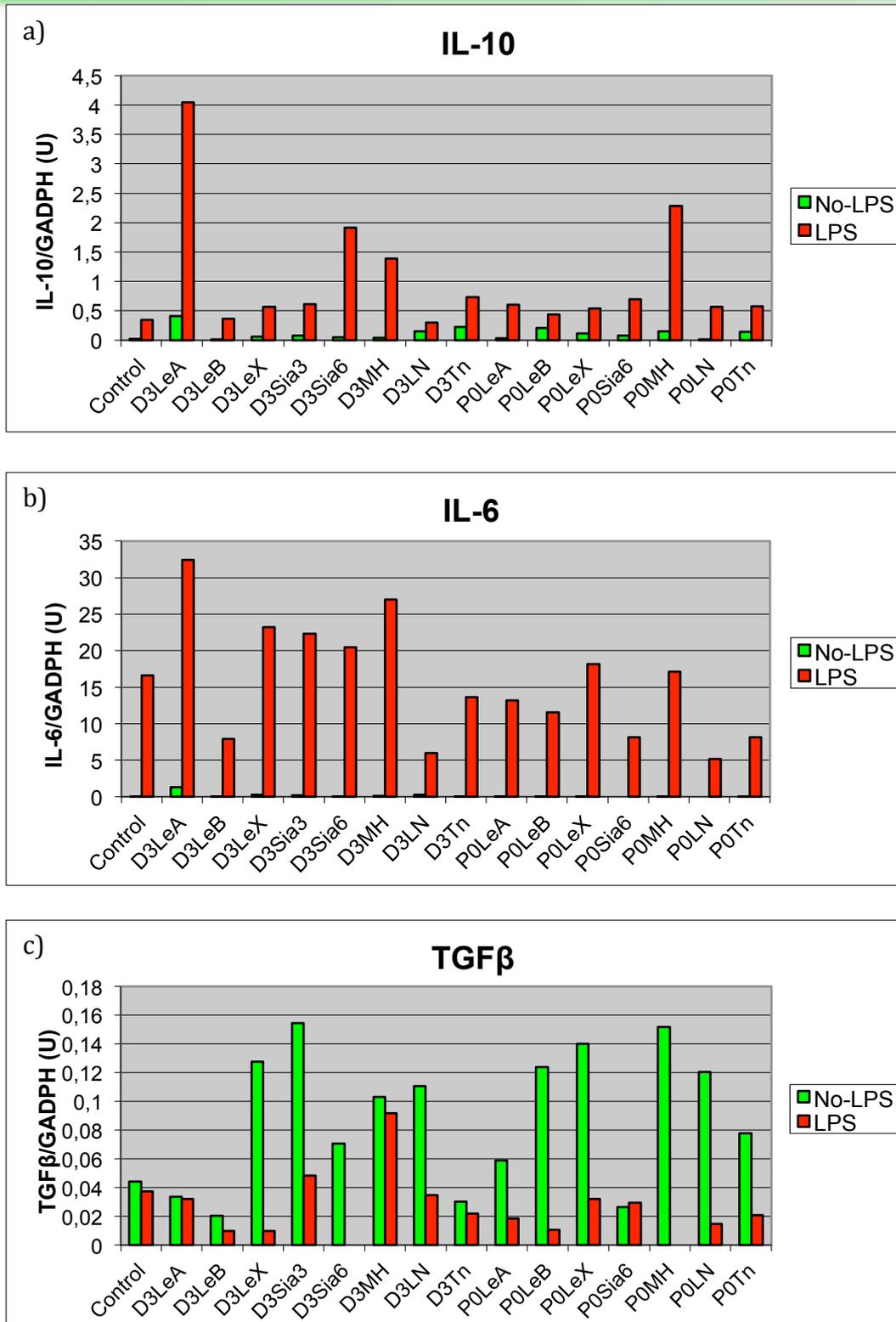
## 5.- RESULTADOS

### 5.5C. Niveles de expresión de ARNm de IL-10, IL-6 y TGF $\beta$ en células dendríticas derivadas de monocitos estimuladas con los diferentes glicopéptidos del péptido 33mer desaminado.

El siguiente paso fue estudiar el efecto que tenían estos compuestos glicosilados derivados del d33mer sobre la expresión a nivel de ARNm de la principal citocina anti-inflamatoria (IL-10), la citocina pro-inflamatoria (IL-6), y la citocina implicada (junto con la IL-6) en la respuesta Th17 (TGF $\beta$ ) en las CDmo. Estas CDmo fueron estimuladas con los diferentes glicopéptidos (glicopéptido-dendrímero o glicopéptido sólo) durante 6h. De cada compuesto se hace un duplicado donde se añade LPS a concentración 1  $\mu$ g/ml. Cada una de las condiciones se hace por triplicado y el experimento se repitió en 3 ocasiones diferentes. Los resultados de la qPCR fueron normalizados con el gen *housekeeping* GAPDH y expresados en unidades arbitrarias (U).

Los resultados mostraron que los glicopéptidos derivados del péptido d33mer (tanto con dendrímero como sin dendrímero) no son capaces de producir ninguna variación en la expresión basal de ARNm de IL-10 en CDmo. Sin embargo, las CD estimuladas con LPS y los glicopéptidos D3LeA, D3Sia6, D3MH y P0MH mostraban un aumento de la expresión de ARNm de IL-10 en comparación con el basal estimulado únicamente con LPS, siendo mucho mayor en las CD estimuladas con LPS y D3LeA (figura 28A).

En el caso de IL-6 los glicopéptidos sin la acción sinérgica del LPS, no fueron capaces de producir ninguna variación en los niveles de expresión basal de ARNm de IL-6, en las CDmo estimuladas con ellos. Sin embargo, al añadir LPS al estímulo, D3LeA y D3MH produjeron un gran aumento en los niveles de expresión de IL-6, mientras que D3LeX, D3sia3 y D3Sia6 produjeron un aumento más moderado de la expresión de ARNm de IL-6 en las CD estimuladas con ellos y LPS, comparado con el cultivo basal con LPS. En las CDmo estimuladas con LPS y los glicopéptidos D3LeB, D3Ln, P0LeB, P0Sia6, P0Ln y P0Tn se observó una disminución de los niveles de expresión de ARNm de IL-6 respecto al basal estimulado con LPS (figura 28B).



**Figura 28: Aumento de la expresión de ARNm de IL-10 y TGFβ, y disminución de la expresión de IL-6 inducida por ciertos glicopéptidos derivados del péptido 33mer desaminado.** Niveles de expresión de ARNm de (A) IL-10, (B) IL-6 y (C) TGFβ en CD derivadas de monocitos de pacientes sanos, medido por qPCR. Los resultados de las tres repeticiones por condición y de los 3 experimentos independientes han sido expresados como la media de los ratio molécula/GADPH para cada condición dentro de cada molécula, en unidades arbitrarias (U). Como control negativo se utilizó CD estimuladas o no con LPS.

## 5.- RESULTADOS

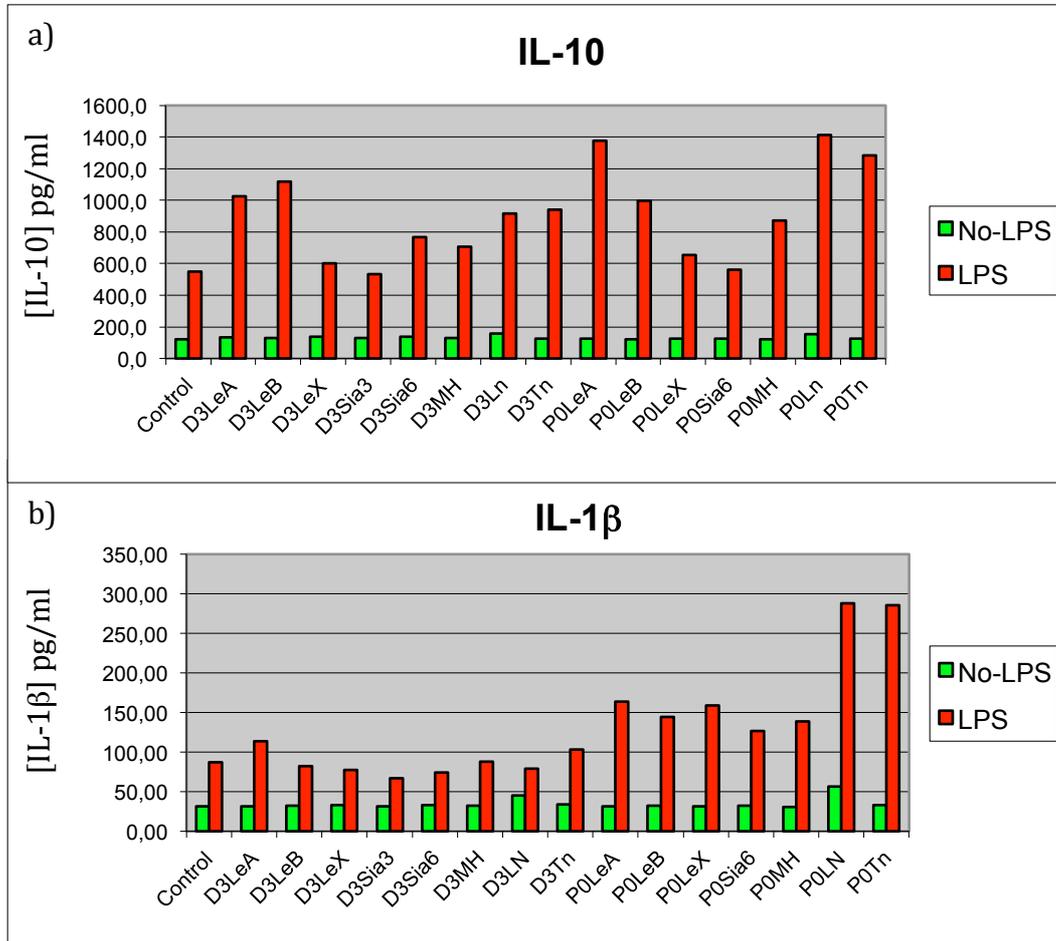
Al estudiar los niveles de expresión de ARNm de TGF $\beta$ , observamos que algunos glicopéptidos eran capaces de modificar los niveles basales sin la acción sinérgica del LPS, de tal forma que D3LeX, D3Sia3, D3MH, D3Ln, P0LeB, P0LeX, P0MH y P0Ln eran capaces de producir un gran aumento de la expresión de esta citocina respecto al cultivo basal. Este aumento también fue producido por D3Sia6 y P0Tn aunque en mucha menor medida. Cuando se añadió LPS junto con los glicopéptidos, se produjo una disminución de la expresión de ARNm de TGF $\beta$  en las CDmo cultivadas con D3LeB, D3LeX, D3Sia6 (que prácticamente inhibe TGF $\beta$  por completo), P0LeB y P0Ln. Sólo cuando se añadió LPS junto a D3MH los niveles de expresión de ARNm de TGF $\beta$  fueron más elevados respecto al basal con LPS, incluso llegando a niveles de expresión de las CD que fueron estimuladas únicamente con este glicopéptido, sin añadir LPS (figura 28C).

### **5.5D. Niveles de secreción de proteína de IL-10, IL-6, IL-12p70, TGF $\beta$ e IL-1 $\beta$ en el sobrenadante del cultivo de células dendríticas derivadas de monocitos estimuladas con los diferentes glicopéptidos del péptido 33mer desaminado.**

Puesto que los diferentes glicopéptidos de la gliadina fueron capaces de producir alteraciones en los niveles basales de expresión de ARNm de IL-10, IL-6 y TGF $\beta$  en las CDmo, nos propusimos estudiar los niveles de proteína secretada de estas citocinas. Además, se estudiaron también los niveles de proteína secretada de IL-12p70 e IL-1 $\beta$  mediante ELISA. Para realizar este estudio, las CDmo fueron estimuladas con los diferentes glicopéptidos (glicopéptido-dendrímero o glicopéptido sólo) durante 18h. De cada compuesto se hace un duplicado donde se añade LPS a concentración 1  $\mu$ g/ml. Cada una de las condiciones se hace por triplicado y el experimento se repitió en 3 ocasiones diferentes. Los resultados del ELISA fueron medidos a una absorbancia de 450nm, normalizados con una curva de calibración realizada con la citocina estudiada a diferentes concentraciones y representados en pg/ml.

De acuerdo a los resultados obtenidos, las CDmo estimuladas únicamente con los glicopéptidos no aumentaron la concentración de IL-10 secretada respecto al basal. Al estimular las CDmo con LPS junto con P0LeA, P0Ln y P0Tn se produjo un gran aumento de IL-10 secretada en comparación con el basal estimulado con LPS. Este aumento también fue observado, pero en menor medida, en el sobrenadante de las

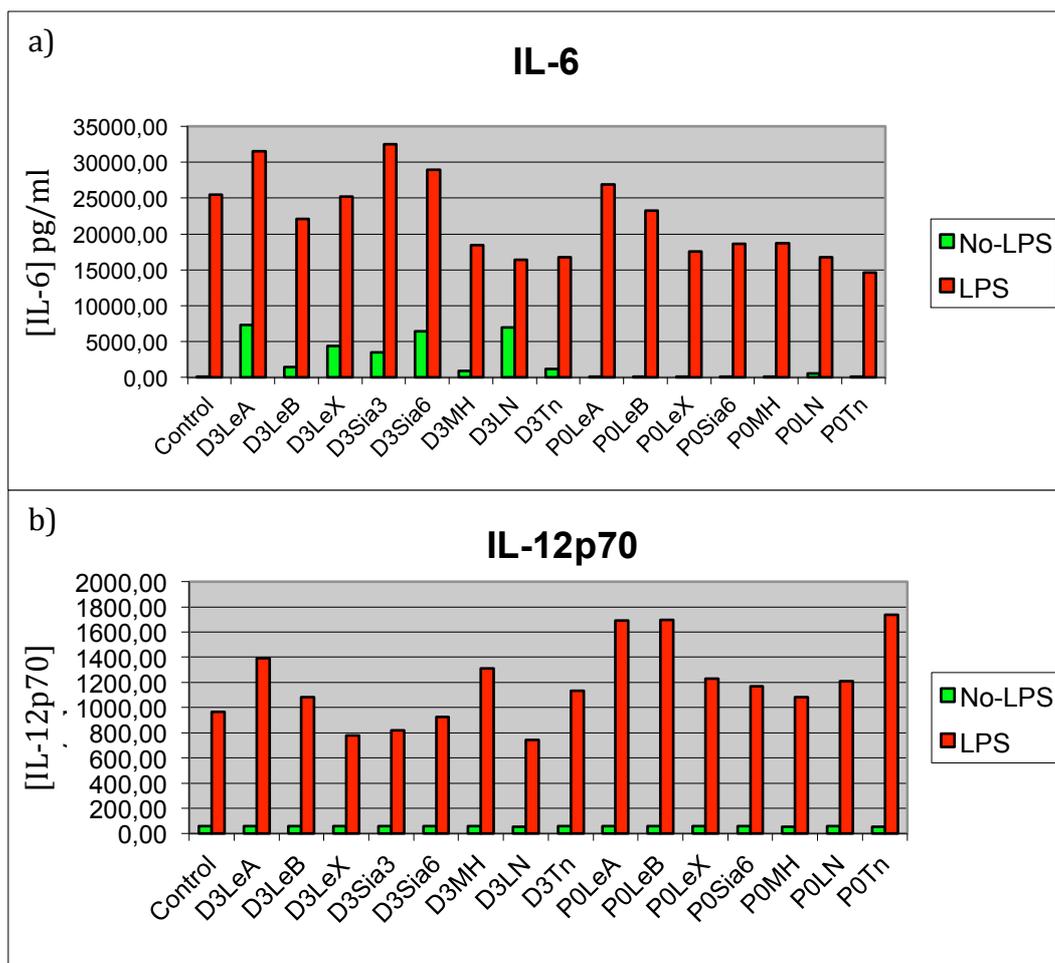
CDmo estimuladas con D3LeA, D3LeB, D3Ln, D3Tn, P0LeB y P0MH donde se añadió LPS (figura 29A).



**Figura 29: Aumento de la concentración de IL-10 e IL-1 $\beta$  inducida por ciertos glicopéptidos derivados del 33mer desaminado en acción sinérgica con el LPS.** Concentración de proteína secretada de (A) IL-10 y (B) IL-1 $\beta$  en CD derivadas de monocitos de pacientes sanos, analizado mediante ELISA a 450nm. Los resultados de las tres repeticiones por condición y de los 3 experimentos independientes han sido expresados como la media de las concentraciones [pg/ml] para cada condición dentro de cada citocina. Como control negativo se utilizaron CD sin estimular o estimuladas únicamente con LPS.

Al igual que en el caso anterior, en los cultivos de CD con los glicopéptidos en ausencia de LPS, no se produjeron variaciones en la concentración de IL-1 $\beta$  secretada. Al añadir LPS al estímulo, únicamente los glicopéptidos no unidos a dendrímico produjeron un aumento en la concentración de IL-1 $\beta$  secretada, respecto al cultivo basal con LPS, siendo mucho mayor este aumento en los cultivos con P0Ln y P0Tn (figura 29B).

## 5.- RESULTADOS



**Figura 30: Disminución de la concentración de las citocinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-12p70 inducida por ciertos glicopéptidos derivados del péptido 33mer desaminado en acción sinérgica con el LPS.** Concentración de proteína secretada de (A) IL-6 y (B) IL-12p70 en CD derivadas de monocitos de pacientes sanos, analizado mediante ELISA a 450nm. Los resultados de las tres repeticiones por condición y de los 3 experimentos independientes han sido expresados como la media de las concentraciones [pg/ml] para cada condición dentro de cada citocina. Como control negativo se utilizaron CD sin estimular o estimuladas únicamente con LPS.

En el caso de IL-6, los glicopéptidos unidos a dendrímeros, sin la acción sinérgica del LPS, produjeron un leve aumento de la concentración de IL-6 secretada en comparación con el basal, que no se produjo en los glicopéptidos sin dendrímero. Sin embargo, al añadir LPS al estímulo, D3LeA (igual que a nivel de expresión de ARNm) y D3Sia6 produjeron un leve aumento en los niveles de IL-6 secretada en comparación con el cultivo basal con LPS. Por el contrario, los estímulos con D3MH, D3Ln, D3Tn, P0LeX, P0Sia6, P0MH, P0Ln y P0Tn, en acción sinérgica con el LPS, produjeron una disminución de la concentración de proteína secretada de IL-6 por las CD, en comparación con el basal estimulado únicamente con LPS (figura 30A). No se

encontraron niveles detectables de TGF $\beta$  secretada en ninguna de las condiciones estudiadas.

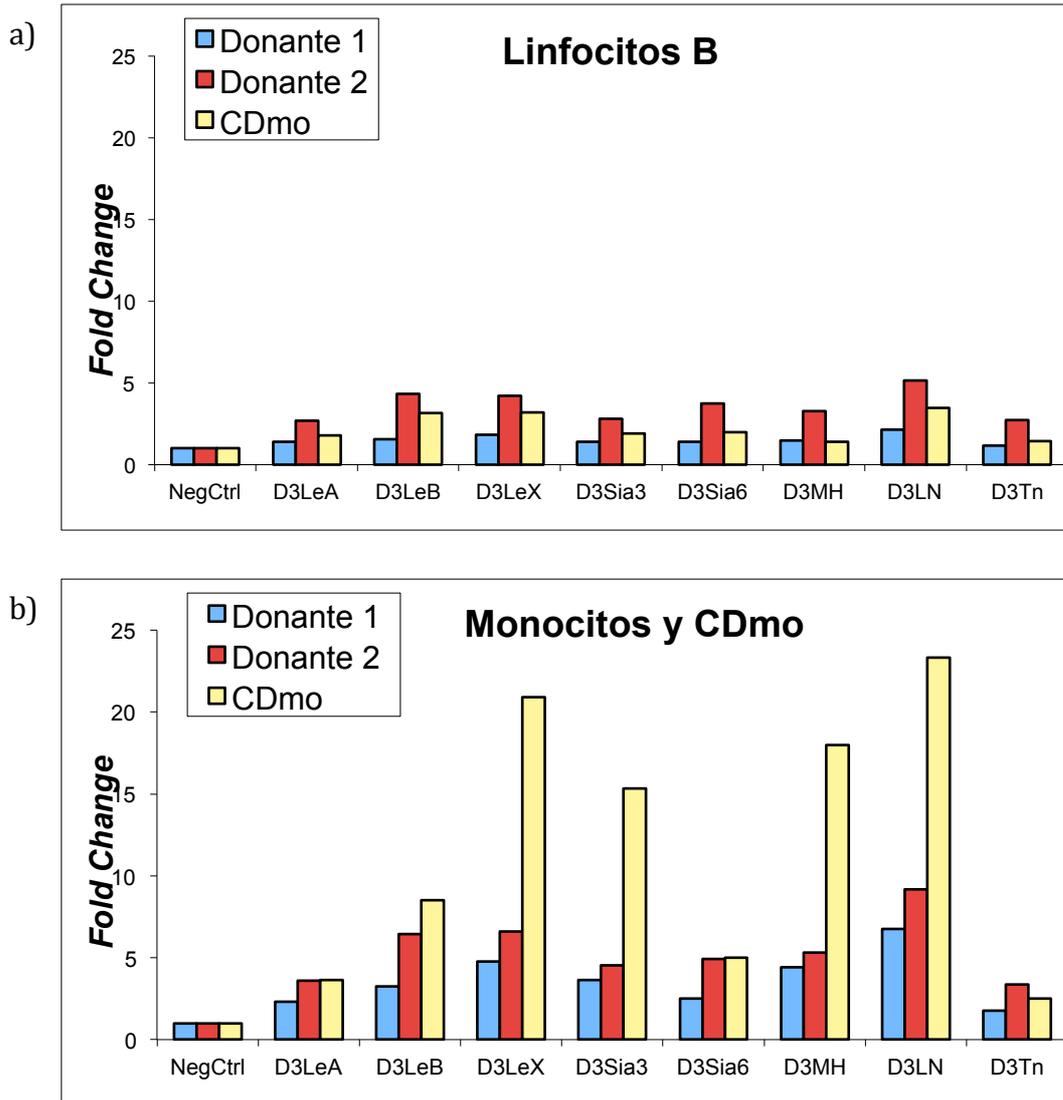
En ausencia de LPS los glicopéptidos no produjeron variaciones en la concentración de IL-12p70 secretada por las CDmo respecto al cultivo basal. Cuando se añadió LPS al estímulo, únicamente se produjo un aumento de la concentración de IL-12p70 secretada en los cultivos de CDmo estimuladas con P0LeA, P0LeB y P0Tn, en comparación con el cultivo basal estimulado con LPS. El resto de glicopéptidos no produjeron variaciones, o incluso produjeron un leve descenso (D3LeX, D3Sia3 y D3Ln) de la concentración de IL-12p70 secretada respecto al cultivo basal estimulado con LPS (figura 30B).

### **5.5E. Los glicopéptidos dendriméricos derivados del péptido 33mer desaminado son captados únicamente por células dendríticas.**

Para determinar si las CD, y solo éstas, eran capaces de captar nuestros compuestos para su procesamiento y posterior presentación antigénica, se marcaron todos los compuestos con el fluorocromo ATTO-633 con CMSP de dos donantes diferentes no celiacos y CDi provenientes de monocitos en el sexto día de diferenciación. Las CMSP se marcaron con anticuerpos de citometría anti-CD19, CD14 y CD11c con el fin de diferenciar entre monocitos, CD y linfocitos B y se analizaron las diferentes subpoblaciones, para determinar si se había producido la captación del péptido correspondiente. Los resultados obtenidos del análisis se representaron como el número de veces (*Fold change*) que aumenta o disminuye el porcentaje de células positivas para fluorescencia de ATTO-633 con respecto al estado basal (cultivo basal sin nada).

No se obtuvieron valores detectables de fluorescencia de los compuestos glicosilados simples no unidos a dendrímeros. Esto se debió seguramente a que estos compuestos sólo presentaban una molécula adherida de ATTO-633, mientras que los compuestos glicosilados en forma dendrimérica (con 32 glicopéptidos formando el dendrímero) presentaban 32 moléculas de ATTO-633, una por glicopéptido, capaces de producir una mayor intensidad de fluorescencia al ser analizadas por citometría de flujo.

## 5.- RESULTADOS



**Figura 31: Los glicopéptidos dendriméricos derivados del péptido 33mer desaminado son captados únicamente por células dendríticas.** Niveles de captación de D3LeA, D3LeB, D3LeX, D3Sia3, D3Sia6, D3MH, D3Ln y D3Tn (A) por linfocitos B y por (B) células dendríticas y monocitos de 2 donantes sanos y en CDmo mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos del análisis se representaron como el *Fold Change* o número de veces que aumenta o disminuye el porcentaje de células positivas para fluorescencia de ATTO-633 con respecto al estado basal (cultivo basal sin nada).

Los resultados obtenidos mostraron que no se produjo una captación de los glicopéptidos dendriméricos por parte de los linfocitos B en ninguno de los pacientes estudiados (figura 31A). Cuando se realizó el cultivo de CMSP de los 2 donantes con los diferentes glicopéptidos, y se analizó la captación de éstos por las subpoblaciones de CD y monocitos, se observó que no existía un aumento de la captación de los glicopéptidos ni en CD ni en monocitos, en comparación con el cultivo basal. En el caso de las CD esto se debe a que, en condiciones normales, casi no hay CD en sangre

periférica en condiciones normales. En el caso de los monocitos, posiblemente se debió a que estas células no fueron capaces de captar los glicopéptidos estudiados en las condiciones de cultivo utilizadas (figura 31B). Únicamente cuando se realizó una estimulación de CDmo con los diferentes glicopéptidos marcados con ATTO-633, se observó que estas células fueron capaces de captar los glicopéptidos dendriméricos, siendo mayor para D3LeX, D3Sia3, D3MH y D3Ln (figura 31B).

### **5.5F. Las células dendríticas estimuladas con los diferentes glicopéptidos derivados de la glicosilación del péptido 33mer desaminado no son capaces de inducir una respuesta linfoproliferativa.**

Posteriormente se estudió la capacidad de las CD estimuladas con nuestros compuestos glicopeptídicos para procesar y presentar estos glicopéptidos a linfocitos T reactivos frente al gluten.

El ensayo consistió en el cultivo de CD irradiadas de donantes celíacos DQ2/DQ8 con 3 concentraciones diferentes de nuestros compuestos (0.3µg/ml, 1µg/ml, 3µg/ml). Después se realizó un cocultivo de estas CD con linfocitos T reactivos frente al gluten, *Sacha2* ( $\alpha 9$  specific T cell) y *Sacha16* ( $\alpha 2$  specific T cell) (proporcionados por el Dr. Fritz Koning). Las células se marcaron con tritio midiéndose la linfoproliferación. Como control positivo se utilizaron linfocitos T reactivos madurados con citocinas específicas que inducen su linfoproliferación y como control negativo linfocitos a los que no se les añadió nada. También se estudió la linfoproliferación frente al péptido d33mer no modificado, en cadena sencilla o en disposición dendrimérica, y frente a la  $\alpha$ -gliadina. Los valores obtenidos fueron representados en Unidades de Fluorescencia de Centelleo (UFC).

Los resultados obtenidos muestran como los glicopéptidos derivados del 33mer desaminado no fueron capaces de inducir ningún tipo de respuesta linfoproliferativa ni de linfocitos T *Sacha 2* ni de linfocitos T *Sacha 16*, en comparación con sus respectivos basales (resaltado en verde). Sin embargo, tanto el péptido d33mer (en cadena sencilla o en disposición dendrimérica) como la  $\alpha$ -gliadina (ambos resaltados en amarillo) indujeron una gran linfoproliferación de ambos tipos de linfocitos T reactivos frente al gluten, incluso por encima de la linfoproliferación inducida por las citocinas específicas de proliferación linfocitaria en el caso de *Sacha2* (resaltado en rojo) (tabla 7).

## 5.- RESULTADOS

Sacha2 ( $\alpha$ 9 specific T cell)																		
Dendrímeros									Glicopéptidos no dendrímicos									
0,3			1			3			0,3		1		3					
LeA	25	65		100	80		279	81		61	30		25	61		166	66	
LeB	20	45		35	50		132	432		30	36		35	40		681	1100	
LeX	40	25		65	100		2666	1651		30	36		30	30		731	96	
MH	70	35		55	135		157	584		10	46		20	61		313	227	
LN	26	5		42	26		1513	1705		52	10		41	36		41	86	
Tn	21	37		31	16		104	62		21	36		41	25		132	20	
Sia6	5	21		26	31		390	2032		94	36		86			102	203	
Sia3	37	16		21	26		62	47										
d33mer	18506	16316	14925	25307	19489	20550	23903	24571	25884	13158	11442	14503	18832	14068	12452	19752	19039	23652
$\alpha$ 9/2	13782	16347		28626	21296		32500	41080										
Nada	101	30	61															
IIs	10443	11064	10912															

Sacha16 ( $\alpha$ 2 specific T cell)																		
Dendrímeros									Glicopéptidos no dendrímicos									
0,3			1			3			0,3		1		3					
LeA	95	90		265	95		345	279		30	30		116	121		333	621	
LeB	40	30		45	85		366	625		30	66		177	61		545	1120	
LeX	85	25		65	421		675	371		41	46		40	106		212	409	
MH	225	65		70	110		437	625		46	15		96	101		318	283	
LN	26	42		42	115		421	275		16	26		61	76		442	142	
Tn	10	16		16	37		244	270		36	52		91	76		335	173	
Sia6	26	52		156	256		463	426		83	36		51	46		244	147	
Sia3	21	31		26	37		78	120										
d33mer	4753	6121	6036	8312	7002	5188	5645	7949	9559	3420	3500	3230	3355	3440	4151	4893	3998	6163
$\alpha$ 9/2	1273	754		1600	1880		2881	2140										
Nada	40	20	45															
IIs	3285	3512	3679															

**Tabla 7: Las células dendríticas estimuladas con los glicocompuestos derivados del péptido 33mer desaminado no inducen proliferación de linfocitos T específicos de gluten.** Proliferación de linfocitos T reactivos frente al gluten (Sacha2,  $\alpha$ 9 specific T cell y Sacha16,  $\alpha$ 2 specific T cell) en cocultivo con células dendríticas estimuladas con 3 concentraciones diferentes (0.3 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml, 3 $\mu$ g/ml) de los glicocompuestos derivados del péptido 33mer desaminado. El análisis se llevó a cabo en un contador de centelleo y los resultados se expresaron en Unidades de Fluorecencia de Centelleo (UFC). Como control positivo se utilizaron linfocitos T estimulados con citocinas de proliferación linfocitaria (resaltado en rojo). Como control negativo se utilizó un cocultivo de los linfocitos T con CD sin estimular (resaltado en verde). También se midió la linfoproliferación frente a la  $\alpha$ -gliadina y el 33mer desaminado (tanto en disposición dendrímica como en cadena sencilla) (resaltado en amarillo). *Los datos de esta gráfica han sido obtenidos en colaboración con la Dra. Verónica Montserrat.*

## **6.- DISCUSIÓN**

---

## 6.- DISCUSIÓN

---

Las características del tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal es responsable de una respuesta inmunitaria altamente especializada. Sin embargo, el intestino soporta una gran carga antigénica que requiere de una respuesta rápida e inespecífica, denominada inmunidad innata, para mantener la homeostasis y proteger al organismo de la entrada de patógenos (Pearson et al., 2012; Reschner et al., 2008). La carga antigénica soportada por este órgano está compuesta no sólo por los antígenos derivados de los alimentos, sino también por la flora saprófita presente de forma permanente. La mayor parte de esta carga antigénica no desencadena una respuesta inmunitaria *lesiva* por parte del tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal, y tanto el epitelio como la mucosa subyacente suponen la primera barrera protectora frente a bacterias y antígenos patógenos que pueden producir un estado inflamatorio. En el tejido intestinal no sólo se van a desarrollar procesos de tolerancia frente a antígenos no patógenos, sino también, en ciertas ocasiones, se va a desencadenar una respuesta inmunológica *protectora* frente a cualquier agente externo (Mowat, 2003; Peterson and Artis, 2014). Las principales poblaciones del sistema inmunitario encargadas de mantener la homeostasis intestinal y de desencadenar una respuesta activa, en caso de que sea necesaria, son los linfocitos intraepiteliales (LIE) (Cheroutre et al., 2011; Hayday et al., 2001) y las poblaciones de la LP (Macdonald and Monteleone, 2005). Entre estas últimas destacan las células dendríticas (CD) gracias a que son las células presentadoras de antígeno profesionales más potentes que existen (Banchereau and Steinman, 1998) y representan el nexo de unión entre la respuesta innata y una respuesta altamente especializada, como es la respuesta inmunitaria adaptativa (Rescigno, 2014).

Los LIE son una población heterogénea, compuesta sobre todo por células  $T\alpha\beta$ ,  $T\gamma\delta$  y células NK, que se encuentran intercalados entre los enterocitos. No sólo son efectores del sistema inmunitario, sino también mediadores de la tolerancia oral, mantienen la integridad epitelial e intervienen en la vigilancia anti-tumoral (Acheson and Luccioli, 2004; Cheroutre et al., 2011). Esto es debido a las siguientes características de los LIE: contacto directo con los antígenos de la luz intestinal, procesos de diferenciación extratímicos, complejidad fenotípica, especificidad para reconocer antígenos propios y potencialmente patogénicos, y especialización funcional con características entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (Cheroutre et al., 2011; Cheroutre and Madakamutil, 2005). Sin embargo, su estado activado en

## 6.- DISCUSIÓN

---

ambientes pro-inflamatorios sugiere que estas poblaciones pueden contribuir a iniciar y/o exacerbar una respuesta patológica, como ocurre en la EII y la EC (Abadie et al., 2012; Cheroutre et al., 2011).

Las poblaciones de LIE están distribuidas de manera diferente en el epitelio del intestino delgado y del intestino grueso (Cheroutre et al., 2011; Mowat, 2003). Estas variaciones parecen evidentes, ya que ambos tramos intestinales presentan diferentes funciones digestivas y condiciones fisiológicas. Sin embargo, los estudios del sistema inmunitario asociado a ambos tramos intestinales no toman en cuenta las diferentes partes dentro de cada uno de los tramos. Por ello, en esta tesis nos planteamos el estudio de las poblaciones de LIE a lo largo del intestino, distinguiendo entre el duodeno y el íleon dentro del intestino delgado, y entre el colon proximal y distal dentro del intestino grueso. Para ello utilizamos la técnica de citometría de flujo.

Dentro del intestino delgado, el compartimento intraepitelial del íleon presenta un mayor porcentaje de linfocitos T comparado con el duodeno. Además, aunque la subpoblación dominante en el compartimento epitelial son los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en ambas partes intestinales, la mucosa ileal presenta un aumento de esta subpoblación respecto al duodeno. Sin embargo, en el duodeno se observó un aumento de la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y de la población NK-like, respecto al íleon. Todos estos datos juntos sugieren que el íleon presenta un estado basal de mayor activación, desde el punto de vista inmunológico, que el duodeno, debido a una mayor proporción de linfocitos T citotóxicos. Una posible explicación es la carga antigénica soportada por ambos tramos intestinales. El duodeno es la primera porción del intestino delgado, donde pasa directamente el contenido del estómago y donde continúa el procesamiento de los alimentos. Es por ello que los antígenos alimentarios son más complejos en el duodeno que en el íleon, donde las moléculas alimentarias son más sencillas en este último. Por ello, el duodeno tiene que tener un sistema inmunitario más "tolerante" frente a los antígenos complejos no patogénicos para evitar una respuesta inmunitaria anómala.

En esta tesis no se han analizado las diferencias entre las poblaciones de LIE del duodeno y yeyuno. Varios autores realizaron estudios sobre las variaciones que sufren estas poblaciones con el fin de ser utilizadas como herramienta diagnóstica en la EC. Prasad et al. (Prasad et al., 2009) no encontraron diferencias en los porcentajes de las subpoblaciones de LIE al comparar el bulbo duodenal (primera porción del duodeno), el

duodeno distal y el yeyuno, por lo que el diagnóstico era válido independientemente de donde se tomara la biopsia. Por ello, consideramos que en los pacientes sanos, los porcentajes de LIE no varían entre estas dos porciones del intestino delgado, aunque sería necesario un estudio más exhaustivo en dichos pacientes.

Parece evidente que las diferencias encontradas en el compartimento intraepitelial de duodeno e íleon pueden deberse a las diferentes funciones que cumplen cada uno de estos tramos intestinales, así como su separación espacial y la carga antigénica que soporta cada uno de ellos. Sin embargo, el colon siempre se ha considerado como una única parte del intestino, desde el punto de vista anatómico y funcional, aunque el colon derecho (proximal o ascendente) e izquierdo (distal o descendente) presentan diferente origen embriológico, vascularización y drenaje linfático, además de una actividad enzimática distinta (Seitz et al., 1996; Simren et al., 2003). En publicaciones recientes se ha observado que el cáncer colorectal afecta de manera diferente a estas dos partes del colon (Bauer et al., 2012; Benedix et al., 2011) aumentando su gravedad según nos vamos acercando al recto (Yamauchi et al., 2012). Ya dentro del compartimento epitelial, se ha observado que las células epiteliales del colon ascendente y del colon descendente difieren en su perfil de expresión génica (Glebov et al., 2003). Por ello nos planteamos analizar si existen diferencias en el compartimento intraepitelial entre ambas partes del colon. Los datos obtenidos por citometría de flujo revelan que el colon derecho presenta un mayor porcentaje de LIE totales, siendo fundamentalmente linfocitos T clásicos ( $CD3^+T\alpha\beta^+$ )  $CD8^+$ . Sin embargo, el colon izquierdo presenta un aumento de los linfocitos  $T\gamma\delta$  ( $CD3^+T\gamma\delta^+$ ) y de células *NK-like* respecto al colon derecho, así como de linfocitos T  $CD4^+$ . En este caso, el colon proximal o derecho presenta un fenotipo epitelial más activo desde el punto de vista inmunológico que el colon izquierdo o distal.

Debido a la proximidad entre ambos tramos intestinales, decidimos estudiar si estas variaciones en las subpoblaciones de LIE eran debidas a diferencias en la expresión de los ligandos propios de las moléculas que intervienen en los mecanismos de migración de los LIE y las CD a la mucosa intestinal. Las células T que migran al intestino expresan el heterodímero  $\alpha4\beta7$  en su superficie (Lefrancois et al., 1999) ya que su ligando, la molécula MAdCAM-1, se expresa en las células endoteliales de las vénulas postcapilares de la LP del intestino delgado y grueso (Berg et al., 1993; Berlin et al., 1993; Nakache et al., 1989). Otra molécula que controla la migración a los tejidos intestinales es el receptor de quimiocinas CCR9. Su ligando, la molécula CCL25, se

## 6.- DISCUSIÓN

expresa en las células epiteliales del intestino delgado (Johansson-Lindbom and Agace, 2007; Wurbel et al., 2000; Zabel et al., 1999) siguiendo un gradiente con su mayor expresión en el extremo proximal que disminuye progresivamente en el íleon para no ser detectable en el colon (Ericsson et al., 2006).

Debido a esto, se analizó la expresión de ARNm de los ligandos de  $\beta 7$ . Como la molécula  $\beta 7$  puede co-expresar  $\alpha 4$  o  $\alpha E$ , nosotros realizamos el estudio de la expresión de ARNm de MADCAM1 (ligando de  $\alpha 4\beta 7$ ) y e-cadherina (ligando de  $\alpha E\beta 7$ ) encontrando una disminución en la expresión de e-cadherina en el colon derecho. CCR9, una molécula considerada tradicionalmente como un marcador de migración a intestino delgado también se encuentra en las CD del colon (Wurbel et al., 2000; Zabel et al., 1999). El análisis molecular realizado en las biopsias de colon derecho e izquierdo demostró que existe una disminución de la expresión de ARNm de su ligando CCL25 ( $p < 0.05$ ) en el colon derecho humano. La migración de las CD a los nódulos linfáticos es dependiente de CCR7, por lo tanto, aunque algunas CD CCR7<sup>+</sup> pueden ser encontradas en el intestino delgado de pacientes sanos, estas células son prácticamente inexistentes en el colon humano (Al-Hassi et al., 2013). Estudios previos realizados en el Antigen Presentation Research Group (Imperial College Londres, Reino Unido) confirmaron la presencia de niveles de expresión muy bajos de CCR7 en CD de colon de pacientes sanos que, además, estaban más disminuidas en el colon derecho (Bernardo D. comunicación personal), lo cual se correlaciona con los niveles de expresión de ARNm más bajos de sus ligandos CCL19 y CCL21 en el colon derecho que nosotros hemos encontrado. Por tanto, las moléculas que controlan este “código postal inmunológico” no parecen controlar únicamente el tejido diana de migración, sino también el tipo de célula migradora, ya que se ha descrito que los monocitos, linfocitos T y linfocitos B usan marcadores de migración diferenciados incluso cuando migran al mismo tejido (Luster et al., 2005; Mora, 2008). Estos mecanismos diferenciados en distintas poblaciones leucocitarias podrían permitir una especialización funcional de las respuestas inmunitarias en diferentes segmentos del tracto gastrointestinal.

En conclusión, las variaciones en las poblaciones de LIE a lo largo del intestino podría deberse a varios factores: la función digestiva y las condiciones fisiológicas asociadas a cada tramo, la flora bacteriana presente en cada parte (Pearson et al., 2012) y, por último, la expresión diferencial de los ligandos propios de los marcadores de migración selectiva de las células inmunitarias.

Los cambios en las subpoblaciones de LIE son una característica constante en la mucosa duodenal de los pacientes con EC por lo que su caracterización mediante citometría de flujo es una herramienta diagnóstica de utilidad en la práctica clínica (Leon, 2011). El primer cambio que hemos detectado en los pacientes celíacos en actividad es un aumento del número de LIE totales. Este aumento se debe tanto a una mayor proliferación celular como a una reducción de las CEI cuando existe lesión de la mucosa duodenal (Camarero et al., 2000; Carton et al., 2004; Eiras et al., 1998). Una segunda anomalía que hemos observado en la EC es el aumento de los LIE TCR $\gamma\delta^+$  y LIE TCR $\alpha\beta^+$  (Holm et al., 1992; Spencer et al., 1989). Sin embargo, mientras que el aumento de LIE TCR $\alpha\beta$  se correlaciona con la actividad de la enfermedad (Camarero et al., 2000) y se corrige en la DSG, el aumento de LIE TCR $\gamma\delta^+$  se mantiene estable en todas las fases de la enfermedad. Por ejemplo, en Finlandia, donde el DSG es seguida rigurosamente por razones sociales y de salud, los LIE TCR $\gamma\delta^+$  siguen estando elevados en el 60 % de los celíacos en tratamiento (Koskinen et al., 2010). El aumento de LIE T $\gamma\delta$  no es específico de la EC, ya que se ha de vez en cuando se encuentran en otras situaciones, como la intolerancia a la leche de vaca, alergias alimentarias, criptosporidiasis, giardiasis, el síndrome de Sjögren y la deficiencia de IgA (Leon et al., 2004). Sin embargo, este aumento tiende a ser leve y transitorio en estas otras patologías (Kokkonen et al., 2000), lo que permite el diagnóstico diferencial. En algunos casos, este aumento puede corresponderse a la EC latente (Arranz et al., 1994), siendo el aumento de esta población un buen biomarcador en las formas atípicas de la EC (Camarero et al., 2000). El último cambio que se produce en el compartimento intraepitelial de los pacientes celíacos es la disminución de la población *NK-like* (CD103<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD7<sup>+</sup>) (Spencer et al., 1989) que se vuelve prácticamente indetectable en la fase activa de la EC. Esta disminución también la hemos observado en pacientes con otras patologías gastroduodenales diferentes de la EC que presentaban inflamación de la mucosa duodenal (pacientes EGI-NoEC). Sin embargo, en estos pacientes no se produjo un aumento de la población de linfocitos T $\gamma\delta$  y la disminución de la población *NK-like* no era tan marcada como en los pacientes celíacos en actividad.

La determinación combinada de las variaciones en las tres poblaciones de LIE estudiadas es lo que aporta la mayor especificidad y sensibilidad a esta prueba diagnóstica de la EC, particularmente en las presentaciones atípicas de la EC e incluso en la forma de expresión cutánea de la sensibilidad al gluten (dermatitis herpetiforme), en las que tanto las alteraciones anatomopatológicas como los marcadores séricos son

## 6.- DISCUSIÓN

de aparición inconstante (Savilahti et al., 1997). Además, la persistencia de un número elevado de LIE en la biopsia de control tras el tratamiento de exclusión de gluten ayuda en la detección de transgresiones dietéticas (Leon, 2011). Los porcentajes obtenidos en cada una de las subpoblaciones de LIE en cada uno de los grupos estudiados fueron muy similares a los obtenidos por otros grupos (Calleja et al., 2011; Camarero et al., 2000; Leon et al., 2004), por lo que nos permitió validar este método como una herramienta útil en el diagnóstico de la EC y de aplicación beneficiosa en la práctica clínica diaria. Los LLP también están implicados en la patogenia de la EC, sin embargo, estas células no sufren variaciones tan características como los LIE en la fase activa de la enfermedad, además el estudio de las poblaciones celulares de la LP requiere un tratamiento agresivo con colagenasa que podría alterar los resultados. Por todo ello, el estudio de las variaciones de los LIE por citometría de flujo resulta ser una herramienta potente y eficaz que complementa el diagnóstico de EC.

Otra de las poblaciones que se encuentra en el compartimento intraepitelial intestinal son las células T *natural killer* invariantes (iNKT), con características tanto innatas como adaptativas, siendo claves en los fenómenos de tolerancia oral, a pesar de encontrarse en una proporción mucho menor que el resto de poblaciones de LIE (Middendorp and Nieuwenhuis, 2009; van Dieren et al., 2007). Sin embargo, las alteraciones cuantitativas y/o funcionales de esta subpoblación puede favorecer la aparición de diversas patologías como la EII y la EC. En el desarrollo de esta tesis, se estudiaron las células iNKT intestinales en el contexto de la EC mediante un enfoque molecular y celular. Todos estos experimentos se realizaron en colaboración con el Dr. David Bernardo, actualmente en el Imperial College, Londres.

Los resultados obtenidos muestran un aumento de la población de iNKT, con un fenotipo predominante CD4<sup>+</sup>, en el compartimento intraepitelial del duodeno de los pacientes celíacos. Asimismo, se encontró una correlación entre la expresión de ARNm de V $\alpha$ 24 y i) la gravedad de la lesión de la mucosa, y ii) la expresión de ARNm de IFN $\gamma$ , tanto en condiciones basales como tras la estimulación de biopsias duodenales con gluten. Por último, el balance entre la expresión de ARNm de V $\alpha$ 24 y de FoxP3 podría definir un perfil molecular característico de la EC. En conclusión, nuestros resultados sugieren que las células iNKT intraepiteliales duodenales podrían desempeñar un papel activo en la patogénesis de la EC.

Las células iNKT juegan un papel clave en los mecanismos de tolerancia oral (Kim et al., 2006a; van Dieren et al., 2007), y su depleción hepática conduce a la incapacidad de desarrollar estos mecanismos en modelos de ratón (Trop et al., 1999). Además, estas células intervienen en el desarrollo de CD tolerogénicas intestinales que, a su vez, son las responsables de la proliferación de las células Treg (Shevach et al., 2001). Debido a las características innatas y adaptativas de estas células, y su capacidad de producir grandes cantidades de IL-4 e IFN $\gamma$  al activarse (van der Vliet et al., 2004; van der Vliet et al., 2001), se ha sugerido que las células iNKT podrían estar implicadas en la patogenia de la EII (Grose et al., 2007b) y de la EC (Grose et al., 2007a). Algunos estudios han caracterizado los porcentajes de células iNKT circulantes en los pacientes con EC, a menudo con resultados contradictorios (Bernardo et al., 2008; Grose et al., 2007a; van der Vliet et al., 2001), pero pocos han analizado el porcentaje de estas células en la mucosa duodenal (Calleja et al., 2011; Grose et al., 2007a; Grose et al., 2008).

En contraposición a nuestros resultados, Grose et al. encontraron un porcentaje reducido de células iNKT en la mucosa duodenal de los pacientes celíacos, determinado mediante qPCR (Grose et al., 2007a; Grose et al., 2008) y por inmunofluorescencia (Grose et al., 2007a). Las diferencias entre nuestro estudio y el publicado por Grose et al., radican en que estos autores no discriminan entre las iNKT intraepiteliales y las iNKT de la LP, utilizando ambas poblaciones en el cómputo general (Grose et al., 2007a), mientras que nosotros hemos encontrado un mayor número de células iNKT únicamente en el epitelio, sin producirse variaciones en la LP. Además, nuestros hallazgos celulares se correlacionaron también con la expresión de ARNm de V $\alpha$ 24, a pesar de que dichos estudios moleculares también contradicen los resultados obtenidos por Grose et al. (Grose et al., 2007a; Grose et al., 2008). Una posibilidad para explicar tal discrepancia podría ser que el ARNm de V $\alpha$ 24 duodenal varía entre diferentes poblaciones. Sin embargo, nuestros resultados han sido confirmados en dos muestras poblacionales pertenecientes a individuos de diferentes continentes, descartando dicha posibilidad. Además, el aumento de la expresión de ARNm de V $\alpha$ 24 encontrado en el duodeno de los pacientes celíacos se correlacionó con el porcentaje de células iNKT intraepiteliales analizado por citometría de flujo, con el grado de lesión histológica (según clasificación de Marsh modificada) y con la expresión de ARNm de IFN $\gamma$ , tanto en biopsias frescas como en biopsias de pacientes celíacos en DSG cultivadas con una solución de gliadina, dando más consistencia a nuestros resultados. Somos conscientes

## 6.- DISCUSIÓN

de que la expresión de la cadena TCR V $\alpha$ 24 no es exclusiva de las células iNKT y por lo tanto podemos estar identificando otros tipos de células (por citometría de flujo y qPCR). Sin embargo, el análisis de la molécula V $\alpha$ 24 es más restrictiva que V $\beta$ 11 (Bernardo et al., 2008; van der Vliet et al., 2004). De hecho, la identificación de células iNKT por la expresión de ARNm se ha propuesto recientemente como una alternativa más fiable que el estudio de la co-expresión de CD3 y CD161, debido a que los linfocitos T intraepiteliales (no NKT) pueden inducir la expresión de CD161 tras su activación (Wingender and Kronenberg, 2008).

Como se ha comentado anteriormente, los LIE son una población heterogénea compuesta principalmente por células T citotóxicas CD8<sup>+</sup>, cuyo papel principal es el mantenimiento de la integridad epitelial mediante la eliminación de las células inmunitarias activadas y el estímulo de la reparación epitelial. La activación desregulada y el aumento del número de LIE es un sello distintivo de EC, donde estas células están involucradas en la destrucción de las células epiteliales y en el desarrollo de la atrofia vellositaria (Abadie et al., 2012; Meresse et al., 2006). Los mecanismos subyacentes a la expansión masiva de LIE productores de IFN $\gamma$  que se produce en la EC aún no se conocen en profundidad. Meresse et al. (Meresse et al., 2006) observaron una expansión oligoclonal, acompañándose de una profunda reprogramación génica que produce un aumento de la actividad citolítica de estas células en la EC. Estos LIE expresan receptores propios del linaje NK, como NKG2C, NKp44 y NKp46, que tras activarse inducen la fosforilación de ZAP-70, la secreción de citocinas pro-inflamatorias, la proliferación celular independiente de la señalización vía TCR y la regulación a la baja de la expresión del TCR en su superficie. Todas estas características son propias de la población iNKT (Yu and Porcelli, 2005), aunque no se puede concluir que realicen estas funciones en el duodeno celíaco y que estas células iNKT sean responsables del daño tisular.

El IFN $\gamma$  es esencial en la inmunopatogénesis de la EC. Esta citocina es producida principalmente por las células Th1 específicas de gluten. Sin embargo, estudios recientes sugieren que los LIE son una fuente importante de IFN $\gamma$ , y que la producción de dicha citocina puede persistir incluso después de la DSG (Meresse et al., 2012; Olausson et al., 2002). Nuestros resultados muestran una correlación entre el aumento de la expresión de ARNm de IFN $\gamma$  en pacientes con EC (tanto tratados como en actividad), la expresión de ARNm de V $\alpha$ 24<sup>+</sup> en estos pacientes, y el grado de lesión

mucosa (según índice de Marsh modificado). Esta correlación se confirmó también en muestras de biopsias de pacientes celíacos en DSG tras el cultivo de los explantes con una solución de gliadina. Estos resultados, junto con la correlación con la expresión de ARNm de V $\alpha$ 24 y el número total de células iNKT en el epitelio, sugieren que estas células pueden ser una fuente de IFN $\gamma$  en la EC. Sin embargo, esta afirmación requiere de más estudios, que pueden ser difíciles de realizar dado el bajo número de células iNKT. Una posible explicación del papel de las iNKT en la patogenia celíaca puede ser que estas células podrían sufrir una activación pro-inflamatoria al captar glicolípidos presentes en el citoplasma de los enterocitos, que son liberados a la matriz extracelular en los fenómenos de apoptosis ocurridos en la EC activa (Brennan et al., 2011). Esta activación de las células iNKT se vería favorecida por un ambiente rico en IFN $\gamma$  e IL-15, patrón de citocinas propio de la EC (Sarra et al., 2013), siendo la IL-15 una de las principales citocinas implicadas en la activación y función biológica de las células iNKT (Gill et al., 2005).

En este abordaje experimental se estudió también la expresión de ARNm de FoxP3 como una medida indirecta de células Treg. Nuestros resultados muestran que la expresión de ARNm de FoxP3 está disminuida en el duodeno de los pacientes celíacos. Sin embargo, no hemos podido encontrar mediante citometría de flujo, células T que expresen FoxP3 ni en la LP duodenal ni en el compartimiento intraepitelial (datos no mostrados). Una posible explicación podría ser que la expresión de FoxP3 en el ser humano es transitoria, dependiente del entorno y no se limita a las células T con un fenotipo Treg (Bernardo et al., 2012; Pillai et al., 2007). Además, y en oposición a los modelos murinos (Gibbons and Spencer, 2011), hay varias pruebas que sugieren que FoxP3 puede ser expresado también por células que no presentan una función reguladora propiamente dicha, tales como las células epiteliales y las células tumorales (Chen et al., 2008; Ebert et al., 2008; Morgan et al., 2005). Por lo tanto, es probable que mediante el abordaje molecular estemos identificando células que expresan FoxP3, no necesariamente células Treg, y que no han sido identificadas mediante citometría de flujo. Sin embargo, el análisis conjunto de la expresión de ARNm de V $\alpha$ 24 y FoxP3, revela un perfil molecular específico asociado a los pacientes celíacos (tanto en actividad como en DSG), que podría ser utilizado como un biomarcador útil en el diagnóstico de la enfermedad.

## 6.- DISCUSIÓN

---

En conclusión, hemos encontrado un aumento del número de células iNKT en el duodeno de los pacientes celíacos, independientemente del estado de la mucosa. El aumento de los niveles de ARNm de V $\alpha$ 24 se correlaciona con la gravedad de la lesión de la mucosa y con los niveles de ARNm de IFN $\gamma$ . Además, un perfil molecular definido por un aumento de la expresión de ARNm de V $\alpha$ 24 junto con una disminución en la expresión de FoxP3 puede favorecer un estado pro-inflamatorio presente en el duodeno de estos pacientes.

La implicación de los LIE en la patogenia de la EC parece clara y está bien documentada, aunque se requieren estudios más exhaustivos para conocer el papel concreto que cumple cada población de LIE dentro de los mecanismos fisiopatogénicos de la enfermedad. Sin embargo, no ocurre lo mismo en la EII. La gran mayoría de los LIE se caracterizan por un estado de activación parcial y una actividad citotóxica espontánea, lo que contribuye a la defensa temprana contra microorganismos patógenos, células epiteliales intestinales displásicas y células cancerígenas (Kunisawa et al., 2007). Estudios recientes han demostrado que algunas citocinas pro-inflamatorias, como por ejemplo, IL-7, IL-15, IL-21 e IL-23, están implicadas en el desarrollo, activación y supervivencia de los LIE (Kunisawa et al., 2007; Schaefer et al., 2010), lo que indica que estas citocinas pro-inflamatorias pueden desempeñar un papel importante en la respuesta inmunitaria en condiciones inflamatorias, regulada por los LIE, situación que se da en la EII. Liu et al. (Liu et al., 2011) demostraron recientemente que los LIE aislados de pacientes con EII tenían una mayor capacidad citolítica frente a las CEI que los LIE de individuos sanos. Curiosamente, en estos estudios encontraron que la IL-23 podría aumentar fuertemente la actividad citolítica de los LIE en la EII, lo que sugiere que, en condiciones de inflamación, los LIE localizados entre las células epiteliales poseen una gran citotoxicidad contra estas mismas células entre las que se encuentran (Liu et al., 2011). Además, la IL-23 podría inducir la activación de los LIE para producir grandes cantidades de citocinas pro-inflamatorias (por ejemplo, IFN $\gamma$ , TNF, IL-2, IL-17A) (Geremia et al., 2011; Liu et al., 2011). Por lo tanto, estos hallazgos implican que los LIE bajo condiciones inflamatorias, como la EII, pueden estar estrechamente asociados a la lesión mucosa consecuente de la enfermedad. Aunque no se conoce muy bien el papel que juegan los LIE en los mecanismos inmunopatogénicos de la EII, el estudio de las alteraciones que sufren estas poblaciones puede llevarnos a un mejor conocimiento de la enfermedad, así como al desarrollo de nuevos métodos

diagnósticos y/o de caracterización de los pacientes. Por todo ello, en esta tesis nos hemos planteado explorar si en la ECr y la CU se producen modificaciones en la distribución normal de las diferentes poblaciones de LIE en la mucosa afectada por la enfermedad y si la determinación de estas modificaciones por citometría de flujo es útil como método de apoyo al diagnóstico diferencial entre ambas entidades y con otras patologías inflamatorias gastrointestinales.

Al estudiar las diferentes poblaciones de LIE en los pacientes con EII no se encontraron diferencias entre los pacientes con EII y el resto de pacientes, para las subpoblaciones de linfocitos TCR $\gamma\delta$ , linfocitos T CD4 o CD8. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que la mucosa afectada por ECr, independientemente de si se trataba de una muestra de colon o de íleon, presentaba un gran aumento de la población de células NK-*like* al compararlo con el resto de grupos, lo que permitiría diferenciar entre la ECr y el resto de patologías intestinales. Dado que la población de células NK-*like* es complementaria a la población de linfocitos T (juntas suman el 100% de los LIE), se estableció una proporción o ratio entre estas 2 poblaciones (ratio T/NK-*like*), donde se observa claramente que sólo las zonas afectadas por ECr presentan un ratio inferior al punto de corte, independientemente del tramo intestinal estudiado. En estos experimentos no se diferenció entre muestras obtenidas del colon proximal o del colon distal. Sin embargo, y según experimentos previos presentados en esta tesis, el colon distal de los pacientes sanos presenta un mayor porcentaje de células NK-*like* que el colon proximal. Por ello realizamos un nuevo ensayo con biopsias de colon provenientes de pacientes con ECr activa, donde se diagnosticó afectación mucosa mediante estudio anatomopatológico. obteniéndose de cada paciente un explante de colon derecho y otro explante de colon izquierdo, ambos con afectación mucosa por ECr. Los resultados obtenidos muestran que el colon izquierdo afectado por ECr presenta un mayor porcentaje de células NK-*like* en comparación con el colon derecho. Sin embargo, al realizar la proporción T/NK-*like* en estos pacientes, todos los valores resultantes se encuentran por debajo del punto de corte establecido al analizar las muestras anteriores donde no se distinguía entre colon proximal y distal. En conclusión, únicamente los pacientes con ECr presentan un aumento de la población NK-*like* en el compartimento intraepitelial de la mucosa afectada por la enfermedad, lo que nos permite el diagnóstico diferencial entre la ECr y el resto de patologías inflamatorias intestinales. Además, identifica los tramos intestinales del paciente que están afectados por la ECr, lo que lleva a un mejor manejo terapéutico de estos pacientes.

## 6.- DISCUSIÓN

Para saber si este aumento en la población de células *NK-like* tiene una implicación directa en la inmunopatogenia de la ECr, primero tenemos que definir perfectamente lo que es esta población, que fue descrita por primera vez por Spencer et al. en la mucosa duodenal, observando una gran disminución de la misma en los pacientes celíacos (Spencer et al., 1989). La principal característica de esta población es un fenotipo  $CD103^+CD45^+CD3^-$ , aunque se trata de un "cajón de sastre" que engloba varios tipos celulares (Eiras et al., 2000). Howie et al. sugirió en un primer momento que estas células son precursores de los linfocitos T intraepiteliales en la mucosa intestinal (Howie et al., 1998). El hallazgo de un aumento de esta población en la EC refractaria y en los linfomas de células T intestinales, asociados a enteropatía, llevó al grupo de la Dra. Cerf-Bensussan a determinar que estas células podrían ser linfocitos T que han internalizado su TCR en estas condiciones patológicas, contribuyendo a la cronificación de la respuesta inmunitaria (Cellier et al., 1998; Mention et al., 2003). Es decir, serían linfocitos T aberrantes. Sin embargo, estos dos tipos celulares se corresponden con el menor porcentaje de células dentro de la población *NK-like*, y su número es dependiente de la edad del paciente (Camarero et al., 2007).

El mayor porcentaje de la población *NK-like* está constituido por las células NK, con un fenotipo  $CD3^-CD7^+CD103^+CD122^+$  y con un perfil propio de células NK ( $CD161^+CD94^+CD16^-CD56^{+/-}$ ) (Eiras et al., 2000). La hipótesis más aceptada es que se trata de células NK citolíticas con capacidad de producir  $IFN\gamma$  y perforinas (Leon et al., 2003). Por lo tanto, y según nuestros resultados, en la ECr se podría producir un gran aumento de esta población, bajo las condiciones pro-inflamatorias generadas en la respuesta inmunitaria frente a la flora bacteriana, que conlleva la activación de estas células y la lisis de los enterocitos, favoreciendo la lesión mucosa.

Pero, ¿por qué se observa el aumento de células NK intraepiteliales únicamente en los pacientes con ECr? La diferencia puede venir dada por el ambiente de citocinas propio que se produce en la ECr, donde se describe la sobre-expresión de IL-12 e IL-23. Esta expresión aumentada se acompaña también del aumento de la cadena IL-12R $\beta$ 2 en los linfocitos T  $CD4^+$ . La unión entre la citocina y su receptor específico, provoca la activación de factores de transcripción tipo STAT3 o STAT4 en estas células, pudiendo ser uno de los mayores responsables, junto con el STAT1 (inducido por  $IFN\gamma$ ), de la polarización hacia Th1 en esta inflamación (Matsuoka et al., 2004; Mudter et al., 2005; Szabo et al., 2000) (mientras que la respuesta en la CU se caracteriza por un perfil de citocinas principalmente de tipo Th2 como son la IL-4, IL5 e IL-13, pudiendo dar lugar

a una activación y expansión de todas las poblaciones de LIE, no únicamente de la población *NK-like*). Estudios recientes han identificado un infiltrado de células Th17 en los pacientes afectados por ECr, lo que sugiere una mayor complejidad en la respuesta inmunitaria. Esto, sumado al aumento de IL-23, citocina inductora de respuestas Th17, junto con alteraciones en el gen que codifica para el receptor de la IL-23, constituyen uno de los principales pilares inmunopatogénicos en la ECr (Duerr et al., 2006). En consonancia con esta hipótesis están los hallazgos de Liu et al, que encuentran una fuerte activación de las células NK intestinales inducida por IL-23 en pacientes con ECr. Además, estas células muestran un incremento en la secreción de citocinas pro-inflamatorias (IFN $\gamma$  y TNF) y en su capacidad citolítica frente a los enterocitos (Liu et al., 2011). Otros autores, como Fuchs et al. han observado un aumento de células linfoides del grupo 1 productoras de IFN $\gamma$  (al que pertenecen las células NK) en la LP y en el epitelio de pacientes con ECr, en comparación con pacientes con CU e individuos sanos (Fuchs et al., 2013). Por lo tanto, todos estos datos darían consistencia a nuestros resultados, donde observamos un gran aumento de la población *NK-like*, probablemente debido a un gran aumento de células NK, en el compartimento intraepitelial de la mucosa afectada por ECr.

Los LIE participan activamente en la respuesta innata frente al gluten en los pacientes celíacos, y crean el microambiente ideal para que se desencadene la respuesta adaptativa. Esta respuesta generada consiste fundamentalmente en el reconocimiento de péptidos de gluten por linfocitos T específicos con restricción HLA-DQ2/DQ8 tras ser modificados por la TG2 (Kagnoff, 2007; Sollid, 2002). Es decir, que la inmunidad adaptativa mediada por linfocitos T específicos requiere que la presentación antigénica sea llevada a cabo por CD portadoras del elemento de restricción HLA-DQ2/DQ8. La respuesta adaptativa frente al gluten en los pacientes celíacos, también engloba una respuesta humoral mediada por linfocitos B. Las células T específicas de gluten, en el contexto de un perfil Th2 de citocinas (IL-4 e IL-10 entre otras) activan la proliferación de las células B que se diferencian a células plasmáticas y producen anticuerpos frente a los péptidos desaminados derivados del gluten y frente a la enzima TG2 (Dieterich et al., 2000; Qiao et al., 2012). En este contexto, nuestro grupo de investigación identificó en el plasma de pacientes celíacos anticuerpos IgA específicos frente a la forma desaminada de un nuevo péptido de 8 aminoácidos (8mer nativo: FPLQPQQP, 8mer desaminado: FPLQPEQP). Este péptido 8mer, además, se encuentra únicamente en

## 6.- DISCUSIÓN

prolaminas y gluteninas que resultan tóxicas para los celíacos y su secuencia se superpone o es muy similar a la de varios de los epítomos de células T más relevantes en la patogenia de la enfermedad (Vallejo-Diez et al., 2013). Estos hallazgos sugirieron en primer lugar que, al igual que ocurre con los péptidos de gluten identificados como tóxicos para estos pacientes, el péptido 8mer podría tener un efecto directo sobre el epitelio intestinal. En segundo lugar, el péptido 8mer podría ser reconocido por las células T en el contexto de las moléculas HLA-DQ y desencadenar, por tanto, una respuesta inmunitaria en los pacientes celíacos. Por todo ello nos propusimos investigar el posible efecto inmunogénico del péptido 8mer en un modelo *in vitro* de CD de sangre periférica y linfoproliferativo autólogo. Todos estos experimentos se realizaron en colaboración con el Dr. Bernardo, actualmente en el Imperial College, Londres.

Para ello se utilizó la forma desaminada del péptido 8mer debido a que en experimentos previos se habían encontrado anticuerpos IgA específicos frente a este péptido desaminado y no frente a la forma nativa, y al hecho de que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos de la LP reconocen péptidos previamente desaminados y presentados por las CD HLA-DQ2/DQ8<sup>+</sup> (Lundin et al., 1993; Sollid, 2002). La desaminación, realizada por la enzima TG2, consiste en la conversión de residuos de glutamina en ácido glutámico en secuencias del tipo QXP (Q=glutamina, P=prolina, X=otro aminoácido) (Fleckenstein et al., 2004; Molberg et al., 1998), secuencia que encontramos en las posiciones P5, P6 Y P7 del 8mer nativo (FPLQPQQP). Por todo ello, sintetizamos el péptido 8mer en su forma desaminada (FPLQPEQP, conversión de glutamina en ácido glutámico en P6) para estudiar el efecto inmunogénico que puede tener este péptido en un modelo de CD de sangre periférica.

Los resultados obtenidos muestran como el péptido d8mer es capaz de inducir la activación y maduración de CD de sangre periférica tanto en pacientes celíacos (mediante el aumento de la expresión de los marcadores CD80 y CD86), como en los individuos no celíacos (con aumento en la expresión del marcador CD80). Sin embargo, el péptido d8mer no indujo la maduración terminal de las CD, representado por el aumento de la expresión de CD83, seguramente debido a una falta de tiempo en el cultivo, observándose que las CD de pacientes celíacos ya presentaban un aumento de este marcador, debido al estado activado de las CD en estos pacientes. El péptido d33mer fue capaz de inducir la activación/maduración sólo en las CD provenientes de pacientes celíacos (aumento de CD83 y CD86). Ni el péptido 19mer ni el c8mer

produjeron ningún cambio en la expresión de los marcadores de activación/maduración de las CD cultivadas con ellos.

La maduración de las CD está asociada normalmente con la síntesis de un determinado perfil de citocinas. Nuestros resultados revelaron que la CD estimuladas con el péptido d8mer no presentaban un aumento de la expresión de ARNm ni de IFN $\gamma$  ni de TNF $\alpha$  (citocinas representativas de la respuesta Th1), este último directamente relacionado con la ausencia de incremento de la expresión de CD40 en células dendríticas estimuladas con el péptido. Sin embargo, el péptido d8mer indujo un aumento de la expresión de IL-4 (citocina representativa de una respuesta Th2) tanto en los pacientes control como en los pacientes celíacos en DSG. El péptido d8mer también produjo un incremento estadísticamente significativo de la expresión de ARNm de IL-6 y TGF $\beta$  (citocinas inductoras de células Th17) en las CD cultivadas tanto de pacientes control como de pacientes en DSG.

Aunque la inflamación intestinal en la EC se ha considerado tradicionalmente como un perfil de citocinas Th1, mediada principalmente por IFN $\gamma$  (Garrote et al., 2008), los últimos hallazgos sugieren un perfil de citoquinas Th1/Th17. Sabatino et al, describió un aumento de la expresión de IL23p19 en biopsias duodenales de pacientes celíacos (Di Sabatino et al., 2007). Además, Castellanos-Rubio et al. observaron un perfil pro-inflamatorio Th1/Th17, a nivel de expresión de ARNm, en el duodeno de estos pacientes (Castellanos-Rubio et al., 2009). En consonancia con estos datos, el péptido 8mer podría estar favoreciendo esta respuesta Th17 en la mucosa duodenal afectada por la EC. Sin embargo, cabe destacar que nuestros hallazgos sobre los efectos inmunogénicos de este péptido sobre las CD no implica una vía inmunopatogénica exclusiva .

Dada la capacidad del péptido 8mer para inducir la maduración/activación de CD con un perfil de producción de citocinas Th2/Th17 (ARNm) tanto en pacientes celíacos como en controles sanos, nuestro siguiente paso fue determinar si este péptido es capaz de producir linfoproliferación de linfocitos T productores de IFN $\gamma$  en un cultivo de CD estimuladas con el mismo péptido, y de linfocitos vírgenes del mismo paciente. Los resultados obtenidos demuestran como el péptido d8mer es capaz de inducir una proliferación de linfocitos T en todos los individuos estudiados (celíacos en actividad, celíacos tratados y controles sanos), siendo linfocitos T productores de IFN $\gamma$ .

## 6.- DISCUSIÓN

Por todo ello, parece claro que el péptido d8mer es capaz de producir una respuesta inmunitaria pro-inflamatoria, a través de la activación/maduración de CD con un perfil de producción de citocinas Th2/Th17, capaces de inducir la proliferación de linfocitos T productores de IFN $\gamma$ , independientemente de si la presentación antigénica es realizada por CD HLA-DQ2+ (pacientes aEC y DSG-EC) o DQ2- (pacientes C-NoEC). Sin embargo, se han identificado clásicamente dos tipos de péptidos que participan en la patogénesis de la EC: Los llamados péptidos inmunodominantes, como el 33mer, que son capaces de activar la respuesta adaptativa a través de su unión a CD DQ2/DQ8+ (Anderson et al., 2000; Arentz-Hansen et al., 2000; Qiao et al., 2004), y los péptidos inmunotóxicos, como el 19mer, que activan la respuesta innata (Nanayakkara et al., 2013). Aunque algunos péptidos inmunodominantes parecen no ser tóxicos para la mucosa intestinal *in vitro*, no se puede excluir que el mismo péptido pueda ser capaz de desencadenar ambas respuestas (Fraser et al., 2003; Martucci et al., 2003; Shan et al., 2002), lo que explicaría el efecto inmunogénico del d8mer en CD no-DQ2+. Entonces, ¿por qué el péptido d8mer no produce una respuesta inflamatoria en el duodeno de las personas no celíacas?. La explicación podría ser que este péptido no aparece en el intestino de los pacientes no celíacos. Esta hipótesis queda respaldada, como se ha comentado anteriormente, por resultados previos de nuestro grupo de investigación en los que se detectaron anticuerpos IgA específicos frente a la forma desaminada del 8mer en el plasma únicamente de pacientes celíacos en actividad, confirmando que este péptido es un epítipo con habilidad para desencadenar una respuesta humoral *in vivo* en estos pacientes (Vallejo-Diez et al., 2013). Además, el péptido 8mer se identificó por primera vez en nuestro laboratorio durante el análisis del patrón de degradación de la gliadina, que resultó ser específico de pacientes celíacos, compuesto por siete proteasas con pesos moleculares entre 20 kDa y 92 kDa (Bernardo et al., 2009), indicando que este péptido es un subproducto de la degradación diferencial que sufre el gluten en el duodeno celíaco.

Al contrario que el péptido d8mer, según nuestros resultados, el péptido d33mer presenta un efecto inmunogénico pro-inflamatorio en las CD de pacientes celíacos. Este efecto se caracteriza principalmente por el aumento de las moléculas co-estimuladoras CD86 y CD83, induciendo la maduración de las CD de los pacientes celíacos hacia un perfil de producción de citocinas de tipo Th1, representado por el aumento en los niveles de expresión de ARNm de IFN $\gamma$ . Además, estas CD son capaces de producir la

proliferación de linfocitos T productores de IFN $\gamma$  en los pacientes celíacos. Es decir, el péptido d33mer es capaz de inducir una respuesta Th1 sólo en aquellos individuos que presentan CD con la molécula de restricción HLA-DQ2+. Por lo tanto, nuestros resultados están de acuerdo con la hipótesis general de la respuesta adaptativa que se da en el duodeno de los pacientes celíacos (Anderson et al., 2000; Arentz-Hansen et al., 2000; Qiao et al., 2004), a pesar de que el d33mer también produjo un aumento de la expresión de IL-4 e IL-6, en pacientes celíacos en DSG y pacientes no celíacos.

Por otro lado, el péptido 19mer no produjo ni la activación ni la maduración de las CD, y aunque aumentó la expresión de ARNm de IFN $\gamma$  e IL-4 en pacientes celíacos e individuos sanos, las CD cultivadas con este péptido no fueron capaces de inducir una respuesta linfoproliferativa. Esto es debido a que el papel inmunogénico de este péptido no está mediado por las CD de la LP del duodeno celíaco, sino que presentan un efecto tóxico directo sobre el epitelio (Nanayakkara et al., 2013). Este efecto lo produciría fundamentalmente debido a que interfiere en los procesos de tráfico y de reciclaje vesiculares en el interior de los enterocitos, principalmente del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) (Barone et al., 2007; Barone et al., 2010; Barone et al., 2011) y del complejo IL-15/IL-15R (Nanayakkara et al., 2013). Como consecuencia de ello se produce una activación y proliferación de las células inmunitarias implicadas en la patogenia de la EC, perpetuando la respuesta citotóxica frente a las células epiteliales y favoreciendo la respuesta adaptativa (Stepniak and Koning, 2006).

Por último, para evitar que los resultados obtenidos con el péptido 8mer fueran un artefacto debido a su pequeño tamaño o a su secuencia de aminoácidos, se utilizó como control un péptido idéntico al d8mer en el que se cambió el ácido glutámico de la posición 6 por histidina. Estos péptidos son resistentes a las proteasas gastrointestinales, susceptibles a las glutenasas y son capaces de atravesar la barrera epitelial, al igual que su homónimo derivado de la gliadina, pero no son captados por la TG2, ni por las CD DQ2/8+ o por los linfocitos T específicos de gluten (Bethune et al., 2009). Según nuestros resultados, este péptido control fue incapaz de producir activación/maduración de las CD, ni produjo el aumento de la expresión ARNm de ninguna de las citocinas estudiadas y, por supuesto, no indujo una respuesta linfoproliferativa. Por ello, podemos determinar que el efecto inmunogénico del péptido d8mer no es una consecuencia ni de su tamaño ni de su secuencia de aminoácidos.

## 6.- DISCUSIÓN

En resumen, los resultados obtenidos en esta tesis muestran que el péptido desaminado 8mer es capaz de producir una respuesta inmunitaria pro-inflamatoria, a través de la activación/maduración de CD con un perfil de producción de citocinas Th2/Th17, capaces de inducir la proliferación de linfocitos T productores de IFN $\gamma$ , independientemente de si la presentación antigénica es realizada por CD HLA-DQ2+ o DQ2-, no presentando una vía inmunopatogénica exclusiva.

Finalmente, nuestro trabajo se ha centrado en la glicosilación del 33mer, principal péptido implicado en la respuesta adaptativa en la EC, para tratar de modular la respuesta pro-inflamatoria producida por el péptido nativo a través de la señalización mediada por CD DC-SIGN<sup>+</sup>. Estos experimentos fueron realizados durante mi estancia en el laboratorio del Department of Molecular Cell Biology and Immunology, VU University Medical Center, Ámsterdam, Holanda, bajo la supervisión del Dr. García-Vallejo y la Dra. van Kooyk. Como se ha comentado anteriormente, para que se desencadene la respuesta adaptativa en la EC, los péptidos inmunodominantes, como el 33mer, sufren un proceso de desaminación por la TG2 que aumenta su afinidad por las moléculas HLA-DQ2/8 (moléculas de la familia MHC-II) expresadas por las CD de la LP (Molberg et al., 1998; Sjostrom et al., 1998). En este contexto, las CD realizan la presentación antigénica a las células T desencadenando una respuesta de tipo Th1 con gran producción de IFN $\gamma$  (Jabri and Sollid, 2006).

Las estrategias utilizadas para hacer llegar los antígenos a las CD en la inmunoterapia se basan en la entrega directa del antígeno a estas células *in vivo*. Este enfoque requiere que el vehículo del antígeno sea reconocido de manera específica por alguna molécula de superficie de las CD y que sea capaz de internalizar la carga antigénica. Las últimas investigaciones revelan que los CLR serían los receptores adecuados para captar el antígeno en las estrategias inmunoterápicas. Ejemplos de ello sería el uso de CLR tales como DEC-205 (Bonifaz et al., 2002; Boscardin et al., 2006; Hawiger et al., 2001; Kretschmer et al., 2005), DC-SIGN (Burgdorf et al., 2007; Singh et al., 2009; Unger et al., 2012), el receptor de manosa, CLEC9A (Caminschi et al., 2008; Sancho et al., 2008) y langerina (Idoyaga et al., 2011). Dado que estos receptores a menudo muestran diferentes perfiles de expresión entre los distintos subgrupos de CD (Cao et al., 2007; Dudziak et al., 2007; Schreiber et al., 2012), la utilización del ligando específico para cada CLR proporciona la oportunidad de hacer llegar el antígeno de manera específica a un subgrupo o varios de CD (Dudziak et al., 2007). Probablemente,

el estudio más completo que se ha realizado es la utilización del anticuerpo monoclonal NLDC145, ligando del receptor DEC-205 (Kraal et al., 1986). La administración a ratones de complejos NLDC-145/antígeno, dio lugar a la presencia de nódulos linfáticos cargados de antígeno, donde se realizaba correctamente la presentación antigénica a linfocitos T vírgenes que se diferenciaban a células Treg (ocho días después de la exposición) y que llevaban a la eliminación de las células T efectoras (tres semanas después de la exposición) (Bonifaz et al., 2002; Hawiger et al., 2001; Mahnke et al., 2003). Una desventaja del uso de anticuerpos monoclonales para la focalización de antígenos es que todavía provocan reacciones inmunitarias adversas que pueden disminuir la eficacia de la inmunoterapia, incluso dando lugar a efectos secundarios autoinmunes graves (Wang et al., 2012). Una alternativa al uso de anticuerpos es el uso de glicanos, ligandos específicos de los CLR, que carecen del problema de la inmunogeneicidad, tienen baja toxicidad y pueden ser sintetizados en grandes cantidades a un coste relativamente bajo (García-Vallejo et al., 2013).

DC-SIGN es el mejor ejemplo de los CLR que se expresan en las CD y que facilitan las estrategias utilizadas en la inmunoterapia. Esto es debido a que DC-SIGN se expresa fundamentalmente en las CDi convencionales, sobre todo en las mucosas, en la piel y en los nódulos linfáticos, donde normalmente se produce el primer encuentro entre cualquier antígeno y las CD. Una vez que el antígeno es captado por DC-SIGN, se internaliza rápidamente y dirige su carga, vía endolisosomas, a la presentación de la misma mediante moléculas MHC de clase II (Unger et al., 2012; van Liempt et al., 2006). Para comprobar si DC-SIGN era una buena diana en la inmunoterapia de la EC, estudiamos la distribución de células DC-SIGN<sup>+</sup> en el duodeno de pacientes celíacos mediante inmunofluorescencia. Los resultados obtenidos mostraron que DC-SIGN estaba aumentado en las células de la LP de los pacientes celíacos no tratados. En estos pacientes se observó que todas las células DC-SIGN<sup>+</sup> eran HLA-DR<sup>+</sup>, es decir CPA. Por el contrario, tanto en los pacientes no celíacos como los pacientes celíacos en DSG se encontró un menor número de células DC-SIGN/HLA-DR<sup>+</sup>. Además, en estos pacientes se encontraron células HLA-DR<sup>+</sup> que no expresaban DC-SIGN. Por lo tanto, la modulación de la respuesta inmunitaria en los pacientes celíacos utilizando ligandos específicos de DC-SIGN como vehículo del péptido 33mer desaminado parece una buena estrategia en el tratamiento inmunoterápico de la EC. Por ello, sintetizamos glicopéptidos del péptido 33mer desaminado mediante la unión de ligandos propios de DC-SIGN por reacción de la sortasa A.

## 6.- DISCUSIÓN

Al realizar ensayos de estimulación de CDmo de pacientes sanos con estos glicopéptidos nos encontramos con la sorpresa de que ninguno de ellos era capaz de inducir la maduración/activación de estas células (representado por las moléculas HLA-DR, CD86 y CD83), ni de aumentar la expresión de ARNm de IL-10 y de IL-6, mientras que algunos si aumentaron la expresión de TGF $\beta$  (citocina implicada en mecanismos de tolerancia oral). Ninguno de ellos indujo tampoco un aumento en la producción de las citocinas estudiadas: IL-10, IL-6, IL-12p70, IL-1 $\beta$  y TGF $\beta$ . Es decir, los glicopéptidos por sí solos no fueron capaces de activar las CD ni de inducir una respuesta de producción de citocinas. Sin embargo, al añadir LPS (ligando de TLR) al cultivo sí observábamos variaciones de todos los parámetros estudiados respecto al cultivo basal. Estos resultados están en consonancia con los experimentos realizados *in vitro* por Gringhuis et al. (Gringhuis et al., 2009) en los que se observó que la estimulación únicamente de DC-SIGN no iniciaba cambios en el estatus de activación de las CD o en la secreción de citocinas, pero modulaba las cascadas de señalización iniciadas por otros RRP, como son los TLR. El LPS produjo la activación/maduración de las CDmo, no actuando en sinergia con ninguno de los glicopéptidos estudiados. Sin embargo, en los co-cultivos de CDmo con LPS y ciertos glicopéptidos, estos últimos eran capaces de aumentar la expresión de ARNm y la producción de citocinas reguladoras, como IL-10, y disminuir la expresión y producción de citocinas pro-inflamatorias (en comparación con el basal estimulado con LPS) como IL-6, IL12p70 e IL-1 $\beta$ . Es decir, los glicopéptidos podían modular la respuesta pro-inflamatoria inducida por LPS a través del TLR hacia una respuesta "tolerogénica". Los mejores resultados se obtuvieron con los glicanos compuestos por los carbohidratos de tipo Lewis (Lewis<sup>a,b,x</sup>), ya sea en posición lineal o en posición dendrímica, aunque eran sensiblemente mejores en el segundo caso. Estos resultados parecen lógicos ya que estos carbohidratos son los ligandos propios de DC-SIGN capaces en condiciones normales de desencadenar una respuesta anti-inflamatoria (Appelmelk et al., 2003; van Liempt et al., 2006). Esto es debido a que los carbohidratos de tipo Lewis se encuentran en una gran variedad de células del organismo y son reconocidos como ligandos endógenos. Por el contrario, los glicanos con un alto contenido en manosa únicamente se producen en los mamíferos dentro del retículo endoplasmático durante la maduración y modificación de otras glicoproteínas. Por lo tanto, la exposición de glicanos con manosa en el medio extracelular podría ser interpretado por DC-SIGN como una señal de daño celular e

invasión de patógeno, lo que lleva al desencadenamiento de una respuesta pro-inflamatoria (van Liempt et al., 2006).

La construcción de los glicocompuestos del péptido 33mer desaminado se realizó con dos distribuciones espaciales diferentes: en posición lineal, con una sola copia del péptido d33mer, y en posición dendrímica. Los dendrímeros son estructuras esféricas altamente ramificadas, en cuyos extremos terminales se hayan grupos funcionales en forma activada que se unirán a los glicocompuestos que se hayan sintetizado previamente (Biricova and Laznickova, 2009). Las ventajas de este sistema es que permiten orientar geoméricamente los glicanos utilizados y el diseño de dendrímeros con la cantidad deseada de antígeno, además de ser estructuras flexibles y solubles (Biricova and Laznickova, 2009). Al comparar los glicocompuestos en posición lineal con los glicocompuestos dendrímicos en los experimentos realizados durante el trabajo de tesis doctoral, los mejores resultados fueron obtenidos con los segundos. Resultados similares fueron observados por García-Vallejo et al. (García-Vallejo et al., 2013) que llegaron a la conclusión que las estructuras esféricas, como los dendrímeros, son más eficientes como ligando de DC-SIGN debido a la particular orientación de los dominios de reconocimiento de carbohidratos y a la organización en nanodominios que presenta este receptor. Los dendrímeros utilizados en nuestros experimentos fueron dendrímeros PAMAM de tercera generación debido a los datos obtenidos previamente por García-Vallejo et al. Estos datos mostraban que los dendrímeros de baja multivalencia (generaciones 0-1) tenían una baja unión e internalización con DC-SIGN, y no indujeron una proliferación de linfocitos T vía MHC-II. Los dendrímeros más grandes (generaciones 6-7), no producían una mejor unión, internalización y presentación antigénica que los de generaciones intermedias, sin embargo tenían un tamaño mayor del estimado para DC-SIGN. Los dendrímeros de generaciones intermedias (3-5) mostraron una unión, internalización y presentación antigénica muy eficientes, e indujeron la proliferación de células T (García-Vallejo et al., 2013). Además, estas moléculas presentaban un tamaño de 20nm, que es la distancia aproximada entre los dominios de reconocimiento de carbohidratos de DC-SIGN (Menon et al., 2009).

Una de las características que debe tener el vehículo utilizado en la inmunoterapia es que sea captado únicamente por las células específicas a las que va dirigido, en nuestro caso las CD DC-SIGN<sup>+</sup>. Para estudiar si nuestros glicocompuestos se unían solamente a estas células, realizamos varios ensayos de captación con CMSP y

## 6.- DISCUSIÓN

---

con CDmo. Los resultados obtenidos muestran como nuestros glicocompuestos en disposición dendrímica no se unían ni a linfocitos B ni a monocitos. Sin embargo, las CDmo eran las únicas células capaces de captar nuestros glicocompuestos derivados del 33mer desaminado.

Por último, quisimos analizar si las CD eran capaces de internalizar, procesar y realizar la presentación antigénica de nuestros glicocompuestos e inducir una respuesta linfoproliferativa. Los resultados obtenidos en los ensayos de linfoproliferación con linfocitos T reactivos frente a la gliadina revelaron que los glicocompuestos no eran capaces de inducir una respuesta linfoproliferativa mediada por CD DQ2<sup>+</sup> en ningún caso. A día de hoy no conocemos a ciencia cierta el motivo por el que no se produjo la respuesta linfoproliferativa esperada. Puede ser porque no se produce la internalización de los glicocompuestos por falta de tiempo en la reacción o por falta de concentración de los mismos. Un segundo motivo sería un defecto en el procesamiento de los glicopéptidos dentro de los lisosomas. En este aspecto, la utilización de lisinas que favorecieran el procesamiento intracelular del glicopéptido podría ser la solución (García-Vallejo et al., 2013). Por último, que los linfocitos reactivos frente al gluten fueran incapaces de reconocerlos como un antígeno al ser presentados por moléculas MHC de clase II. En este último caso, podría ser interpretado como una ventaja, en vez de como un problema, debido a que aunque nuestros glicopéptidos no produzcan una respuesta linfoproliferativa, sí modulan la respuesta iniciada por los TLR, y da lugar a un perfil de producción de citocinas anti-inflamatorias por parte de las CD estimuladas con ellos, favoreciendo un microambiente regulatorio en la mucosa duodenal que podría desembocar en tolerancia frente al péptido nativo 33mer. Sin embargo se requiere una investigación mucho más profunda para llegar a tales conclusiones.

En resumen, podemos decir que la glicosilación del péptido 33mer con ligandos endógenos específicos de DC-SIGN, como son los carbohidratos de tipo Lewis, podría llevar a la modulación de la respuesta pro-inflamatoria generada por el gluten en el duodeno de los pacientes celíacos. Sin embargo, para llegar a esta conclusión hace falta recorrer un largo camino no exento de muchos obstáculos, que se ha iniciado con esta tesis, y que esperamos continúe hasta llegar al desarrollo de una inmunoterapia segura y eficaz para los pacientes celíacos.

## **7.- CONCLUSIONS / CONCLUSIONES**



### CONCLUSIONS

1.- Under normal conditions, the intraepithelial compartment from the ileum showed an increased number of T cells, with a higher proportion of CD8<sup>+</sup> T cells and a decreased number of the NK-like cells, compared to the duodenum.

2.- The epithelium of distal colon from healthy individuals showed an increase number of T $\gamma\delta$  lymphocytes and NK-like cells compared to proximal colon, as well as CD4<sup>+</sup> T cells. Compared both sections from the colon, differences may be due to the variations observed in the mucosal expression of the gut homing ligands.

3.- The parameters characterizing active celiac disease are the infiltration of intraepithelial lymphocytes, with a decreased NK-like cell populations and a clear increase in the number of T $\gamma\delta$  cells. The figures obtained were consistent with previous reports, and allow us to validate this technique as a supporting method in the diagnosis of the disease.

4.- The intraepithelial compartment from the duodenum of celiac disease patients showed an increased number of iNKT cells, with a predominant CD4<sup>+</sup> phenotype, compared to non-celiac individuals. The mRNA expression of V $\alpha$ 24 showed also a correlation with the severity of the mucosal lesion, and the mRNA expression of IFN $\gamma$ . The balance between V $\alpha$ 24 and FoxP3 mRNA expression may define a pro-inflammatory molecular profile characteristic of celiac disease.

5.- The intraepithelial compartment of the mucosa affected by Crohn's disease showed a large increase of the NK-like cell population, regardless of the origin of the tissue either from the colon or ileum, but this has not been observed in other inflammatory conditions and, therefore, it may be useful for the differential diagnosis and characterization of patients with Crohn's disease.

## 7.- CONCLUSIONS / CONCLUSIONES

---

6.- The deamidated 8mer peptide induces a pro-inflammatory immune response, through the activation/maturation of dendritic cells with a complex profile of cytokine production, which include IL-4, IL-6 and TGF $\beta$ , and the proliferation of IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T cells, regardless of whether antigen presentation is mediated by HLA-DQ2<sup>+</sup> or DQ2-dendritic cells.

7.- An increased DC-SIGN receptor expression was observed in lamina propria cells from untreated celiac patients, compared to other individuals. All DC-SIGN<sup>+</sup> cells were HLA-DR<sup>+</sup> and, therefore, antigen presenting cells. The modulation of the immune response by using DC-SIGN specific ligands as a vehicle for immunogens may be a new therapeutic strategy for this disease

8.-The deaminated 33mer peptide glycans through a dendrimeric arrangement with DC-SIGN specific endogenous ligands, such as Lewis type carbohydrates, are captured only by dendritic cells, where they induce a decreased production of pro-inflammatory cytokines, probably leading to the modulation of the immune response to gluten in the duodenum from celiac patients.

### CONCLUSIONES

- 1.- En condiciones normales, el compartimento intraepitelial del íleon presenta un aumento del número de linfocitos T, con una mayor proporción de células T CD8<sup>+</sup> y disminución de la población de células NK-*like*, comparado con el duodeno.
- 2.- El epitelio del colon distal de individuos sanos presenta un aumento de linfocitos Tγδ y de células NK-*like* respecto al colon proximal, así como de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Comparados ambos tramos del colon, estas diferencias podrían deberse a las variaciones observadas en la expresión mucosa de los ligandos propios de las moléculas de migración selectiva intestinal.
- 3.- Los parámetros que caracterizan la enfermedad celíaca en actividad son el aumento de linfocitos intraepiteliales, la disminución de la población de células NK-*like* y el claro aumento de las células Tγδ. Los valores obtenidos coinciden con los publicados por otros grupos, lo que permite la validación de esta técnica como método de apoyo al diagnóstico de la enfermedad.
- 4.- El compartimento intraepitelial del duodeno de los pacientes celíacos muestra un aumento de la población de células iNKT, con un fenotipo predominante CD4<sup>+</sup>, en comparación con los pacientes no celíacos. Asimismo, se encontró una correlación entre la expresión de ARNm de Vα24, la gravedad de la lesión mucosa, y la expresión de ARNm de IFNγ. El balance entre la expresión de ARNm de Vα24 y de FoxP3 podría definir un perfil molecular pro-inflamatorio característico de la enfermedad celíaca.
- 5.- En el compartimento intraepitelial de la mucosa afectada por enfermedad de Crohn se observa un gran aumento de la población de células NK-*like*, independientemente del origen de la muestra en colon o íleon, no observándose dicho aumento en el resto de patologías inflamatorias, lo que podría tener utilidad en el diagnóstico diferencial y la caracterización de los pacientes con enfermedad de Crohn.

## 7.- CONCLUSIONS / CONCLUSIONES

---

6.- El péptido 8mer desaminado es capaz de estimular una respuesta inmunitaria pro-inflamatoria, a través de la activación/maduración de células dendríticas con un perfil complejo de producción de citocinas en el que destacan IL-4, IL-6, y TGF $\beta$ , y la proliferación de linfocitos T productores de IFN $\gamma$ , independientemente de si la presentación antigénica es mediada por células dendríticas HLA-DQ2+ o DQ2-.

7.- En los pacientes celíacos en actividad se observó un aumento de la expresión del receptor DC-SIGN en células de la lamina propia, comparado con el resto de pacientes. Todas las células DC-SIGN<sup>+</sup> eran HLA-DR<sup>+</sup> y, por tanto, células presentadoras de antígeno. La modulación de la respuesta inmunitaria utilizando como vehículo ligandos específicos de DC-SIGN podría ser una buena estrategia terapéutica en esta enfermedad

8.- Los glicocompuestos del péptido desaminado 33mer en disposición dendrímica con ligandos endógenos específicos de DC-SIGN, como los carbohidratos de tipo Lewis, son captados únicamente por las células dendríticas, donde disminuyen la producción de citocinas pro-inflamatorias y llevan probablemente a la modulación de la respuesta frente al gluten en el duodeno de los pacientes celíacos.

## **8.- REFERENCIAS**

---

## 8.- REFERENCIAS

---

**Abadie, V., Discepolo, V., and Jabri, B.** (2012). Intraepithelial lymphocytes in celiac disease immunopathology. *Semin Immunopathol* 34, 551-566.

**Abadie, V., Sollid, L.M., Barreiro, L.B., and Jabri, B.** (2011). Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annu Rev Immunol* 29, 493-525.

**Abraham, C., and Cho, J.H.** (2009). Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 361, 2066-2078.

**Acheson, D.W., and Luccioli, S.** (2004). Microbial-gut interactions in health and disease. *Mucosal immune responses. Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18, 387-404.  
**Ahmad, T., Marshall, S.E., and Jewell, D.** (2006). Genetics of inflammatory bowel disease: the role of the HLA complex. *World journal of gastroenterology : WJG* 12, 3628-3635.

**Akobeng, A.K., and Thomas, A.G.** (2008). Systematic review: tolerable amount of gluten for people with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* 27, 1044-1052.

**Al-Hassi, H.O., Bernardo, D., Muruganathan, A.U., Mann, E.R., English, N.R., Jones, A., Kamm, M.A., Arebi, N., Hart, A.L., Blakemore, A.I., et al.** (2013). A mechanistic role for leptin in human dendritic cell migration: differences between ileum and colon in health and Crohn's disease. *Mucosal Immunol* 6, 751-761.

**Anderson, R.P., Degano, P., Godkin, A.J., Jewell, D.P., and Hill, A.V.** (2000). In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. *Nat Med* 6, 337-342.

**Anthony, R.M., Wermeling, F., Karlsson, M.C., and Ravetch, J.V.** (2008). Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19571-19578.

**Appelmelk, B.J., van Die, I., van Vliet, S.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Geijtenbeek, T.B., and van Kooyk, Y.** (2003). Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells. *J Immunol* 170, 1635-1639.

**Arentz-Hansen, H., Korner, R., Molberg, O., Quarsten, H., Vader, W., Kooy, Y.M., Lundin, K.E., Koning, F., Roepstorff, P., Sollid, L.M., et al.** (2000). The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J Exp Med* 191, 603-612.

**Arentz-Hansen, H., McAdam, S.N., Molberg, O., Fleckenstein, B., Lundin, K.E., Jorgensen, T.J., Jung, G., Roepstorff, P., and Sollid, L.M.** (2002). Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology* 123, 803-809.

**Arnold, J.N., Wormald, M.R., Sim, R.B., Rudd, P.M., and Dwek, R.A.** (2007). The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* 25, 21-50.

**Arranz, E., Bode, J., Kingstone, K., and 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* 35, 476-482.

- Arrenberg, P., Halder, R., and Kumar, V.** (2009). Cross-regulation between distinct natural killer T cell subsets influences immune response to self and foreign antigens. *Journal of cellular physiology* 218, 246-250.
- Artis, D.** (2008). Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol* 8, 411-420.
- Azuma, T., Takahashi, T., Kunisato, A., Kitamura, T., and Hirai, H.** (2003). Human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress NKT cell functions. *Cancer Res* 63, 4516-4520.
- Balk, S.P., Burke, S., Polischuk, J.E., Frantz, M.E., Yang, L., Porcelli, S., Colgan, S.P., and Blumberg, R.S.** (1994). Beta 2-microglobulin-independent MHC class Ib molecule expressed by human intestinal epithelium. *Science* 265, 259-262.
- Banchereau, J., and Steinman, R.M.** (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Barbara, G., Cremon, C., and Stanghellini, V.** (2014). Inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome: similarities and differences. *Current opinion in gastroenterology* 30, 352-358.
- Barone, M.V., Gimigliano, A., Castoria, G., Paoella, G., Maurano, F., Paparo, F., Maglio, M., Mineo, A., Miele, E., Nanayakkara, M., et al.** (2007). Growth factor-like activity of gliadin, an alimentary protein: implications for coeliac disease. *Gut* 56, 480-488.
- Barone, M.V., Nanayakkara, M., Paoella, G., Maglio, M., Vitale, V., Troiano, R., Ribecco, M.T., Lania, G., Zanzi, D., Santagata, S., et al.** (2010). Gliadin peptide P31-43 localises to endocytic vesicles and interferes with their maturation. *PLoS One* 5, e12246.
- Barone, M.V., Zanzi, D., Maglio, M., Nanayakkara, M., Santagata, S., Lania, G., Miele, E., Ribecco, M.T., Maurano, F., Auricchio, R., et al.** (2011). Gliadin-mediated proliferation and innate immune activation in celiac disease are due to alterations in vesicular trafficking. *PLoS One* 6, e17039.
- Bauer, K.M., Hummon, A.B., and Buechler, S.** (2012). Right-side and left-side colon cancer follow different pathways to relapse. *Molecular carcinogenesis* 51, 411-421.
- Beaudoin, L., Laloux, V., Novak, J., Lucas, B., and Lehuen, A.** (2002). NKT cells inhibit the onset of diabetes by impairing the development of pathogenic T cells specific for pancreatic beta cells. *Immunity* 17, 725-736.
- Bekiaris, V., Persson, E.K., and Agace, W.W.** (2014). Intestinal dendritic cells in the regulation of mucosal immunity. *Immunol Rev* 260, 86-101.
- Benahmed, M., Meresse, B., Arnulf, B., Barbe, U., Mention, J.J., Verkarre, V., Allez, M., Cellier, C., Hermine, O., and Cerf-Bensussan, N.** (2007). Inhibition of TGF-beta signaling by IL-15: a new role for IL-15 in the loss of immune homeostasis in celiac disease. *Gastroenterology* 132, 994-1008.

## 8.- REFERENCIAS

---

**Bendelac, A., Savage, P.B., and Teyton, L.** (2007). The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 25, 297-336.

**Benedix, F., Schmidt, U., Mroczkowski, P., Gastinger, I., Lippert, H., Kube, R., and Study Group "Colon/Rectum, C.** (2011). Colon carcinoma--classification into right and left sided cancer or according to colonic subsite?--Analysis of 29,568 patients. *Eur J Surg Oncol* 37, 134-139.

**Berg, E.L., McEvoy, L.M., Berlin, C., Bargatze, R.F., and Butcher, E.C.** (1993). L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. *Nature* 366, 695-698.

**Berlin, C., Berg, E.L., Briskin, M.J., Andrew, D.P., Kilshaw, P.J., Holzmann, B., Weissman, I.L., Hamann, A., and Butcher, E.C.** (1993). Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 74, 185-195.

**Bernardo, D.** (2013). Human intestinal dendritic cells as controllers of mucosal immunity. *Rev Esp Enferm Dig* 105, 279-290.

**Bernardo, D., Al-Hassi, H.O., Mann, E.R., Tee, C.T., Murugananthan, A.U., Peake, S.T., Hart, A.L., and Knight, S.C.** (2012). T-cell proliferation and forkhead box P3 expression in human T cells are dependent on T-cell density: physics of a confined space? *Hum Immunol* 73, 223-231.

**Bernardo, D., Garrote, J.A., Nadal, I., Leon, A.J., Calvo, C., Fernandez-Salazar, L., Blanco-Quiros, A., Sanz, Y., and Arranz, E.** (2009). Is it true that coeliacs do not digest gliadin? Degradation pattern of gliadin in coeliac disease small intestinal mucosa. *Gut* 58, 886-887.

**Bernardo, D., van Hoogstraten, I.M., Verbeek, W.H., Pena, A.S., Mearin, M.L., Arranz, E., Garrote, J.A., Scheper, R.J., Schreurs, M.W., Bontkes, H.J., et al.** (2008). Decreased circulating iNKT cell numbers in refractory coeliac disease. *Clin Immunol* 126, 172-179.

**Berntman, E., Rolf, J., Johansson, C., Anderson, P., and Cardell, S.L.** (2005). The role of CD1d-restricted NK T lymphocytes in the immune response to oral infection with *Salmonella typhimurium*. *Eur J Immunol* 35, 2100-2109.

**Berzi, A., Reina, J.J., Ottria, R., Sutkeviciute, I., Antonazzo, P., Sanchez-Navarro, M., Chabrol, E., Biasin, M., Trabattoni, D., Cetin, I., et al.** (2012). A glycomimetic compound inhibits DC-SIGN-mediated HIV infection in cellular and cervical explant models. *Aids* 26, 127-137.

**Bethune, M.T., Crespo-Bosque, M., Bergseng, E., Mazumdar, K., Doyle, L., Sestak, K., Sollid, L.M., and Khosla, C.** (2009). Noninflammatory gluten peptide analogs as biomarkers for celiac sprue. *Chem Biol* 16, 868-881.

**Bhagat, G., Naiyer, A.J., Shah, J.G., Harper, J., Jabri, B., Wang, T.C., Green, P.H., and Manavalan, J.S.** (2008). Small intestinal CD8+TCRgammadelta+NKG2A+ intraepithelial lymphocytes have attributes of regulatory cells in patients with celiac disease. *J Clin Invest* 118, 281-293.

**Biricova, V., and Laznickova, A.** (2009). Dendrimers: Analytical characterization and applications. *Bioorganic chemistry* 37, 185-192.

- Bleicher, P.A., Balk, S.P., Hagen, S.J., Blumberg, R.S., Flotte, T.J., and Terhorst, C.** (1990). Expression of murine CD1 on gastrointestinal epithelium. *Science* 250, 679-682.
- Blumberg, R.S., Terhorst, C., Bleicher, P., McDermott, F.V., Allan, C.H., Landau, S.B., Trier, J.S., and Balk, S.P.** (1991). Expression of a nonpolymorphic MHC class I-like molecule, CD1D, by human intestinal epithelial cells. *J Immunol* 147, 2518-2524.
- Bogunovic, M., Ginhoux, F., Helft, J., Shang, L., Hashimoto, D., Greter, M., Liu, K., Jakubzick, C., Ingersoll, M.A., Leboeuf, M., et al.** (2009). Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* 31, 513-525.
- Boismenu, R., and Havran, W.L.** (1994). Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial gamma delta T cells. *Science* 266, 1253-1255.
- Bolscher, J.G., Oudhoff, M.J., Nazmi, K., Antos, J.M., Guimaraes, C.P., Spooner, E., Haney, E.F., Garcia Vallejo, J.J., Vogel, H.J., van't Hof, W., et al.** (2011). Sortase A as a tool for high-yield histatin cyclization. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25, 2650-2658.
- Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M.C., and Steinman, R.M.** (2002). Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med* 196, 1627-1638.
- Boscardin, S.B., Hafalla, J.C., Masilamani, R.F., Kamphorst, A.O., Zebroski, H.A., Rai, U., Morrot, A., Zavala, F., Steinman, R.M., Nussenzweig, R.S., et al.** (2006). Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. *J Exp Med* 203, 599-606.
- Bouma, G., and Strober, W.** (2003). The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 3, 521-533.
- Brennan, P.J., Tatituri, R.V., Brigl, M., Kim, E.Y., Tuli, A., Sanderson, J.P., Gadola, S.D., Hsu, F.F., Besra, G.S., and Brenner, M.B.** (2011). Invariant natural killer T cells recognize lipid self antigen induced by microbial danger signals. *Nat Immunol* 12, 1202-1211.
- Brigl, M., and Brenner, M.B.** (2004). CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol* 22, 817-890.
- Buonocore, S., Ahern, P.P., Uhlig, H.H., Ivanov, II, Littman, D.R., Maloy, K.J., and Powrie, F.** (2010). Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature* 464, 1371-1375.
- Burgdorf, S., Kautz, A., Bohnert, V., Knolle, P.A., and Kurts, C.** (2007). Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* 316, 612-616.
- Calleja, S., Vivas, S., Santiuste, M., Arias, L., Hernando, M., Nistal, E., Casqueiro, J., and Ruiz de Morales, J.G.** (2011). Dynamics of non-conventional intraepithelial lymphocytes-NK, NKT, and gammadelta T-in celiac disease: relationship with age, diet, and histopathology. *Dig Dis Sci* 56, 2042-2049.

## 8.- REFERENCIAS

---

- Camarero, C., Eiras, P., Asensio, A., Leon, F., Olivares, F., Escobar, H., and 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* 89, 285-290.
- Camarero, C., Leon, F., Sanchez, L., Asensio, A., and Roy, G.** (2007). Age-related variation of intraepithelial lymphocytes subsets in normal human duodenal mucosa. *Dig Dis Sci* 52, 685-691.
- Caminschi, I., Proietto, A.I., Ahmet, F., Kitsoulis, S., Shin Teh, J., Lo, J.C., Rizzitelli, A., Wu, L., Vremec, D., van Dommelen, S.L., et al.** (2008). The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood* 112, 3264-3273.
- Cao, W., Zhang, L., Rosen, D.B., Bover, L., Watanabe, G., Bao, M., Lanier, L.L., and Liu, Y.J.** (2007). BDCA2/Fc epsilon RI gamma complex signals through a novel BCR-like pathway in human plasmacytoid dendritic cells. *PLoS biology* 5, e248.
- Cardell, S., Tangri, S., Chan, S., Kronenberg, M., Benoist, C., and Mathis, D.** (1995). CD1-restricted CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *J Exp Med* 182, 993-1004.
- Cario, E.** (2005). Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut* 54, 1182-1193.
- Carpenter, A.C., and Bosselut, R.** (2010). Decision checkpoints in the thymus. *Nat Immunol* 11, 666-673.
- Carter, D., and Eliakim, R.** (2014). Current role of endoscopy in inflammatory bowel disease diagnosis and management. *Current opinion in gastroenterology* 30, 370-377.
- Carton, J., Byrne, B., Madrigal-Estebas, L., O'Donoghue, D.P., and O'Farrelly, C.** (2004). CD4+CD8+ human small intestinal T cells are decreased in coeliac patients, with CD8 expression downregulated on intra-epithelial T cells in the active disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 16, 961-968.
- Castellanos-Rubio, A., Santin, I., Irastorza, I., Castano, L., Carlos Vitoria, J., and Ramon Bilbao, J.** (2009). TH17 (and TH1) signatures of intestinal biopsies of CD patients in response to gliadin. *Autoimmunity* 42, 69-73.
- Catassi, C., and Fasano, A.** (2010). Celiac disease diagnosis: simple rules are better than complicated algorithms. *The American journal of medicine* 123, 691-693.
- Catassi, C., Ratsch, I.M., Fabiani, E., Rossini, M., Bordicchia, F., Candela, F., Coppa, G.V., and Giorgi, P.L.** (1994). Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet* 343, 200-203.
- Cella, M., Fuchs, A., Vermi, W., Facchetti, F., Otero, K., Lennerz, J.K., Doherty, J.M., Mills, J.C., and Colonna, M.** (2009). A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* 457, 722-725.
- Cellier, C., Patey, N., Mauvieux, L., Jabri, B., Delabesse, E., Cervoni, J.P., Burtin, M.L., Guy-Grand, D., Bouhnik, Y., Modigliani, R., et al.** (1998). Abnormal intestinal intraepithelial lymphocytes in refractory sprue. *Gastroenterology* 114, 471-481.

- Cepek, K.L., Shaw, S.K., Parker, C.M., Russell, G.J., Morrow, J.S., Rimm, D.L., and Brenner, M.B.** (1994). Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin. *Nature* 372, 190-193.
- Chang, Y.J., Kim, H.Y., Albacker, L.A., Baumgarth, N., McKenzie, A.N., Smith, D.E., Dekruyff, R.H., and Umetsu, D.T.** (2011). Innate lymphoid cells mediate influenza-induced airway hyper-reactivity independently of adaptive immunity. *Nat Immunol* 12, 631-638.
- Chen, G.Y., Chen, C., Wang, L., Chang, X., Zheng, P., and Liu, Y.** (2008). Cutting edge: Broad expression of the FoxP3 locus in epithelial cells: a caution against early interpretation of fatal inflammatory diseases following in vivo depletion of FoxP3-expressing cells. *J Immunol* 180, 5163-5166.
- Cheroutre, H., Lambolez, F., and Mucida, D.** (2011). The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 11, 445-456.
- Cheroutre, H., and Madakamutil, L.** (2005). Mucosal effector memory T cells: the other side of the coin. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62, 2853-2866.
- Chiu, Y.H., Jayawardena, J., Weiss, A., Lee, D., Park, S.H., Dautry-Varsat, A., and Bendelac, A.** (1999). Distinct subsets of CD1d-restricted T cells recognize self-antigens loaded in different cellular compartments. *J Exp Med* 189, 103-110.
- Cho, J.H.** (2004). Advances in the genetics of inflammatory bowel disease. *Current gastroenterology reports* 6, 467-473.
- Clemente, M.G., De Virgiliis, S., Kang, J.S., Macatagney, R., Musu, M.P., Di Pierro, M.R., Drago, S., Congia, M., and Fasano, A.** (2003). Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut* 52, 218-223.
- Collins, A., Littman, D.R., and Taniuchi, I.** (2009). RUNX proteins in transcription factor networks that regulate T-cell lineage choice. *Nat Rev Immunol* 9, 106-115.
- Coombes, J.L., Siddiqui, K.R., Arancibia-Carcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.M., Belkaid, Y., and Powrie, F.** (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 204, 1757-1764.
- Coquet, J.M., Chakravarti, S., Kyparissoudis, K., McNab, F.W., Pitt, L.A., McKenzie, B.S., Berzins, S.P., Smyth, M.J., and Godfrey, D.I.** (2008). Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 11287-11292.
- Crespo Perez, L., Castillejo de Villasante, G., Cano Ruiz, A., and Leon, F.** (2012). Non-dietary therapeutic clinical trials in coeliac disease. *Eur J Intern Med* 23, 9-14.
- Crocker, P.R., Paulson, J.C., and Varki, A.** (2007). Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol* 7, 255-266.
- Daveson, A.J., Jones, D.M., Gaze, S., McSorley, H., Clouston, A., Pascoe, A., Cooke, S., Speare, R., Macdonald, G.A., Anderson, R., et al.** (2011). Effect of hookworm infection on wheat challenge in celiac disease--a randomised double-blinded placebo controlled trial. *PLoS One* 6, e17366.

## 8.- REFERENCIAS

---

- De Stefano, D., Maiuri, M.C., Iovine, B., Ialenti, A., Bevilacqua, M.A., and Carnuccio, R.** (2006). 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 (Berl)* *84*, 65-74.
- Debard, N., Sierro, F., Browning, J., and Kraehenbuhl, J.P.** (2001). Effect of mature lymphocytes and lymphotoxin on the development of the follicle-associated epithelium and M cells in mouse Peyer's patches. *Gastroenterology* *120*, 1173-1182.
- Denning, T.L., Granger, S.W., Mucida, D., Graddy, R., Leclercq, G., Zhang, W., Honey, K., Rasmussen, J.P., Cheroutre, H., Rudensky, A.Y., et al.** (2007a). Mouse TCRalpha+CD8alpha intraepithelial lymphocytes express genes that down-regulate their antigen reactivity and suppress immune responses. *J Immunol* *178*, 4230-4239.
- Denning, T.L., Wang, Y.C., Patel, S.R., Williams, I.R., and Pulendran, B.** (2007b). Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat Immunol* *8*, 1086-1094.
- Di Sabatino, A., Ciccocioppo, R., Cupelli, F., Cinque, B., Millimaggi, D., Clarkson, M.M., Paulli, M., Cifone, M.G., and Corazza, G.R.** (2006). Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease. *Gut* *55*, 469-477.
- Di Sabatino, A., Pickard, K.M., Gordon, J.N., Salvati, V., Mazzarella, G., Beattie, R.M., Vossenkaemper, A., Rovedatti, L., Leakey, N.A., Croft, N.M., et al.** (2007). Evidence for the role of interferon-alfa production by dendritic cells in the Th1 response in celiac disease. *Gastroenterology* *133*, 1175-1187.
- Diebold, R.J., Eis, M.J., Yin, M., Ormsby, I., Boivin, G.P., Darrow, B.J., Saffitz, J.E., and Doetschman, T.** (1995). Early-onset multifocal inflammation in the transforming growth factor beta 1-null mouse is lymphocyte mediated. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 12215-12219.
- Dieterich, W., Storch, W.B., and Schuppan, D.** (2000). Serum antibodies in celiac disease. *Clin Lab* *46*, 361-364.
- Dube, C., Rostom, A., Sy, R., Cranney, A., Saloojee, N., Garritty, C., Sampson, M., Zhang, L., Yazdi, F., Mamaladze, V., et al.** (2005). The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk Western European populations: a systematic review. *Gastroenterology* *128*, S57-67.
- Dudziak, D., Kamphorst, A.O., Heidkamp, G.F., Buchholz, V.R., Trumpfheller, C., Yamazaki, S., Cheong, C., Liu, K., Lee, H.W., Park, C.G., et al.** (2007). Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* *315*, 107-111.
- Duerr, R.H.** (2003). Update on the genetics of inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* *37*, 358-367.
- Duerr, R.H., Taylor, K.D., Brant, S.R., Rioux, J.D., Silverberg, M.S., Daly, M.J., Steinhardt, A.H., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A., et al.** (2006). A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* *314*, 1461-1463.

- Ebert, E.C.** (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* 115, 118-126.
- Ebert, E.C., and Roberts, A.I.** (1993). Lymphokine-activated killing by human intestinal lymphocytes. *Cellular immunology* 146, 107-116.
- Ebert, L.M., Tan, B.S., Browning, J., Svobodova, S., Russell, S.E., Kirkpatrick, N., Gedye, C., Moss, D., Ng, S.P., MacGregor, D., et al.** (2008). The regulatory T cell-associated transcription factor FoxP3 is expressed by tumor cells. *Cancer Res* 68, 3001-3009.
- Eiras, P., Leon, F., Camarero, C., Lombardia, M., Roldan, E., Bootello, A., and Roy, G.** (2000). Intestinal intraepithelial lymphocytes contain a CD3- CD7+ subset expressing natural killer markers and a singular pattern of adhesion molecules. *Scand J Immunol* 52, 1-6.
- Eiras, P., Roldan, E., Camarero, C., Olivares, F., Bootello, A., and Roy, G.** (1998). Flow cytometry description of a novel CD3-/CD7+ intraepithelial lymphocyte subset in human duodenal biopsies: potential diagnostic value in coeliac disease. *Cytometry* 34, 95-102.
- Ekbom, A., Helmick, C., Zack, M., and Adami, H.O.** (1990). Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* 323, 1228-1233.
- Ericsson, A., Kotarsky, K., Svensson, M., Sigvardsson, M., and Agace, W.** (2006). Functional characterization of the CCL25 promoter in small intestinal epithelial cells suggests a regulatory role for caudal-related homeobox (Cdx) transcription factors. *J Immunol* 176, 3642-3651.
- Farache, J., Zigmond, E., Shakhar, G., and Jung, S.** (2013). Contributions of dendritic cells and macrophages to intestinal homeostasis and immune defense. *Immunology and cell biology* 91, 232-239.
- Farstad, I.N., Carlsen, H., Morton, H.C., and Brandtzaeg, P.** (2000). Immunoglobulin A cell distribution in the human small intestine: phenotypic and functional characteristics. *Immunology* 101, 354-363.
- Farstad, I.N., Halstensen, T.S., Kvale, D., Fausa, O., and Brandtzaeg, P.** (1997). Topographic distribution of homing receptors on B and T cells in human gut-associated lymphoid tissue: relation of L-selectin and integrin alpha 4 beta 7 to naive and memory phenotypes. *Am J Pathol* 150, 187-199.
- Feinberg, H., Mitchell, D.A., Drickamer, K., and Weis, W.I.** (2001). Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science* 294, 2163-2166.
- Fina, D., Sarra, M., Caruso, R., Del Vecchio Blanco, G., Pallone, F., Macdonald, T.T., and Monteleone, G.** (2007). Interleukin-21 Contributes To The Mucosal T Helper Cell Type 1 Response In Celiac Disease. *Gut*.
- Fleckenstein, B., Qiao, S.W., Larsen, M.R., Jung, G., Roepstorff, P., and Sollid, L.M.** (2004). Molecular characterization of covalent complexes between tissue transglutaminase and gliadin peptides. *J Biol Chem* 279, 17607-17616.

## 8.- REFERENCIAS

---

- Forsberg, G., Hernell, O., Melgar, S., Israelsson, A., Hammarstrom, S., and Hammarstrom, M.L.** (2002). Paradoxical coexpression of proinflammatory and down-regulatory cytokines in intestinal T cells in childhood celiac disease. *Gastroenterology* 123, 667-678.
- Fraser, J.S., Engel, W., Ellis, H.J., Moodie, S.J., Pollock, E.L., Wieser, H., and Ciclitira, P.J.** (2003). Coeliac disease: in vivo toxicity of the putative immunodominant epitope. *Gut* 52, 1698-1702.
- Fuchs, A., Vermi, W., Lee, J.S., Lonardi, S., Gilfillan, S., Newberry, R.D., Cella, M., and Colonna, M.** (2013). Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of IL-12- and IL-15-responsive IFN-gamma-producing cells. *Immunity* 38, 769-781.
- Fujihashi, K., Dohi, T., Kweon, M.N., McGhee, J.R., Koga, T., Cooper, M.D., Tonegawa, S., and Kiyono, H.** (1999). gammadelta T cells regulate mucosally induced tolerance in a dose-dependent fashion. *Int Immunol* 11, 1907-1916.
- Fuss, I.J., Heller, F., Boirivant, M., Leon, F., Yoshida, M., Fichtner-Feigl, S., Yang, Z., Exley, M., Kitani, A., Blumberg, R.S., et al.** (2004). Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 113, 1490-1497.
- Gangadharan, D., Lambolez, F., Attinger, A., Wang-Zhu, Y., Sullivan, B.A., and Cheroutre, H.** (2006). Identification of pre- and postselection TCRalpha+ intraepithelial lymphocyte precursors in the thymus. *Immunity* 25, 631-641.
- Garcia-Vallejo, J.J., Ambrosini, M., Overbeek, A., van Riel, W.E., Bloem, K., Unger, W.W., Chiodo, F., Bolscher, J.G., Nazmi, K., Kalay, H., et al.** (2013). Multivalent glycopeptide dendrimers for the targeted delivery of antigens to dendritic cells. *Mol Immunol* 53, 387-397.
- Garcia-Vallejo, J.J., and van Kooyk, Y.** (2009). Endogenous ligands for C-type lectin receptors: the true regulators of immune homeostasis. *Immunol Rev* 230, 22-37.
- Garrote, J.A., Gomez-Gonzalez, E., Bernardo, D., Arranz, E., and Chirido, F.** (2008). Celiac disease pathogenesis: the proinflammatory cytokine network. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 47 Suppl 1, S27-32.
- Geremia, A., Arancibia-Carcamo, C.V., Fleming, M.P., Rust, N., Singh, B., Mortensen, N.J., Travis, S.P., and Powrie, F.** (2011). IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. *J Exp Med* 208, 1127-1133.
- Gianfrani, C., Levings, M.K., Sartirana, C., Mazzarella, G., Barba, G., Zanzi, D., Camarca, A., Iaquinto, G., Giardullo, N., Auricchio, S., et al.** (2006). Gliadin-specific type 1 regulatory T cells from the intestinal mucosa of treated celiac patients inhibit pathogenic T cells. *J Immunol* 177, 4178-4186.
- Gibbons, D.L., and Spencer, J.** (2011). Mouse and human intestinal immunity: same ballpark, different players; different rules, same score. *Mucosal Immunol* 4, 148-157.
- Gill, N., Rosenthal, K.L., and Ashkar, A.A.** (2005). NK and NKT cell-independent contribution of interleukin-15 to innate protection against mucosal viral infection. *J Virol* 79, 4470-4478.

**Glebov, O.K., Rodriguez, L.M., Nakahara, K., Jenkins, J., Cliatt, J., Humbyrd, C.J., DeNobile, J., Soballe, P., Simon, R., Wright, G., et al.** (2003). Distinguishing right from left colon by the pattern of gene expression. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 12, 755-762.

**Godfrey, D.I., MacDonald, H.R., Kronenberg, M., Smyth, M.J., and Van Kaer, L.** (2004). NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol* 4, 231-237.

**Grimm, M.C., and Pavli, P.** (2004). NOD2 mutations and Crohn's disease: are Paneth cells and their antimicrobial peptides the link? *Gut* 53, 1558-1560.

**Gringhuis, S.I., den Dunnen, J., Litjens, M., van der Vlist, M., and Geijtenbeek, T.B.** (2009). Carbohydrate-specific signaling through the DC-SIGN signalosome tailors immunity to Mycobacterium tuberculosis, HIV-1 and Helicobacter pylori. *Nat Immunol* 10, 1081-1088.

**Grose, R.H., Cummins, A.G., and Thompson, F.M.** (2007a). Deficiency of invariant natural killer T cells in coeliac disease. *Gut* 56, 790-795.

**Grose, R.H., Thompson, F.M., Baxter, A.G., Pellicci, D.G., and Cummins, A.G.** (2007b). Deficiency of invariant NK T cells in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 52, 1415-1422.

**Grose, R.H., Thompson, F.M., and Cummins, A.G.** (2008). Deficiency of 6B11+ invariant NK T-cells in celiac disease. *Dig Dis Sci* 53, 1846-1851.

**Grueter, B., Petter, M., Egawa, T., Laule-Kilian, K., Aldrian, C.J., Wuerch, A., Ludwig, Y., Fukuyama, H., Wardemann, H., Waldschuetz, R., et al.** (2005). Runx3 regulates integrin alpha E/CD103 and CD4 expression during development of CD4-/CD8+ T cells. *J Immunol* 175, 1694-1705.

**Gutzeit, C., Magri, G., and Cerutti, A.** (2014). Intestinal IgA production and its role in host-microbe interaction. *Immunol Rev* 260, 76-85.

**Hadis, U., Wahl, B., Schulz, O., Hardtke-Wolenski, M., Schippers, A., Wagner, N., Muller, W., Sparwasser, T., Forster, R., and Pabst, O.** (2011). Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity* 34, 237-246.

**Hart, A.L., Al-Hassi, H.O., Rigby, R.J., Bell, S.J., Emmanuel, A.V., Knight, S.C., Kamm, M.A., and Stagg, A.J.** (2005). Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 129, 50-65.

**Hart, A.L., Ng, S.C., Mann, E., Al-Hassi, H.O., Bernardo, D., and Knight, S.C.** (2010). Homing of immune cells: role in homeostasis and intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 16, 1969-1977.

**Hausch, F., Shan, L., Santiago, N.A., Gray, G.M., and Khosla, C.** (2002). Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283, G996-G1003.

## 8.- REFERENCIAS

---

- Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J.V., Steinman, R.M., and Nussenzweig, M.C.** (2001). Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 194, 769-779.
- Hayday, A., Theodoridis, E., Ramsburg, E., and Shires, J.** (2001). Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nat Immunol* 2, 997-1003.
- Heller, F., Fuss, I.J., Nieuwenhuis, E.E., Blumberg, R.S., and Strober, W.** (2002). Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity* 17, 629-638.
- Holm, K., Maki, M., Savilahti, E., Lipsanen, V., Laippala, P., and Koskimies, S.** (1992). Intraepithelial gamma delta T-cell-receptor lymphocytes and genetic susceptibility to coeliac disease. *Lancet* 339, 1500-1503.
- Hooper, L.V., Littman, D.R., and Macpherson, A.J.** (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 336, 1268-1273.
- Howie, D., Spencer, J., DeLord, D., Pitzalis, C., Wathen, N.C., Dogan, A., Akbar, A., and MacDonald, T.T.** (1998). Extrathymic T cell differentiation in the human intestine early in life. *J Immunol* 161, 5862-5872.
- Hoyler, T., Klose, C.S., Souabni, A., Turqueti-Neves, A., Pfeifer, D., Rawlins, E.L., Voehringer, D., Busslinger, M., and Diefenbach, A.** (2012). The transcription factor GATA-3 controls cell fate and maintenance of type 2 innate lymphoid cells. *Immunity* 37, 634-648.
- Hue, S., Ahern, P., Buonocore, S., Kullberg, M.C., Cua, D.J., McKenzie, B.S., Powrie, F., and Maloy, K.J.** (2006). Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med* 203, 2473-2483.
- Hue, S., Mention, J.J., Monteiro, R.C., Zhang, S., Cellier, C., Schmitz, J., Verkarre, V., Fodil, N., Bahram, S., Cerf-Bensussan, N., et al.** (2004). A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity* 21, 367-377.
- Husby, S., Koletzko, S., Korponay-Szabo, I.R., Mearin, M.L., Phillips, A., Shamir, R., Troncone, R., Giersiepen, K., Branski, D., Catassi, C., et al.** (2012). European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 54, 136-160.
- Idoyaga, J., Lubkin, A., Fiorese, C., Lahoud, M.H., Caminschi, I., Huang, Y., Rodriguez, A., Clausen, B.E., Park, C.G., Trumpfheller, C., et al.** (2011). Comparable T helper 1 (Th1) and CD8 T-cell immunity by targeting HIV gag p24 to CD8 dendritic cells within antibodies to Langerin, DEC205, and Clec9A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 2384-2389.
- Iiai, T., Watanabe, H., Suda, T., Okamoto, H., Abo, T., and Hatakeyama, K.** (2002). CD161+ T (NT) cells exist predominantly in human intestinal epithelium as well as in liver. *Clin Exp Immunol* 129, 92-98.

- Iliev, I.D., Spadoni, I., Mileti, E., Matteoli, G., Sonzogni, A., Sampietro, G.M., Foschi, D., Caprioli, F., Viale, G., and Rescigno, M.** (2009). Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *Gut* 58, 1481-1489.
- Jabri, B., de Serre, N.P., Cellier, C., Evans, K., Gache, C., Carvalho, C., Mougnot, J.F., Allez, M., Jian, R., Desreumaux, P., et al.** (2000). Selective expansion of intraepithelial lymphocytes expressing the HLA-E-specific natural killer receptor CD94 in celiac disease. *Gastroenterology* 118, 867-879.
- Jabri, B., and Sollid, L.M.** (2006). Mechanisms of disease: immunopathogenesis of celiac disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3, 516-525.
- Jabri, B., and Sollid, L.M.** (2009). Tissue-mediated control of immunopathology in coeliac disease. *Nat Rev Immunol* 9, 858-870.
- Jaensson, E., Uronen-Hansson, H., Pabst, O., Eksteen, B., Tian, J., Coombes, J.L., Berg, P.L., Davidsson, T., Powrie, F., Johansson-Lindbom, B., et al.** (2008). Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *J Exp Med* 205, 2139-2149.
- Janeway, C.A., Jr., and Medzhitov, R.** (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216.
- Jiang, S., Game, D.S., Davies, D., Lombardi, G., and Lechler, R.I.** (2005). Activated CD1d-restricted natural killer T cells secrete IL-2: innate help for CD4+CD25+ regulatory T cells? *Eur J Immunol* 35, 1193-1200.
- Jing, Y., Gravenstein, S., Chaganty, N.R., Chen, N., Lyerly, K.H., Joyce, S., and Deng, Y.** (2007). Aging is associated with a rapid decline in frequency, alterations in subset composition, and enhanced Th2 response in CD1d-restricted NKT cells from human peripheral blood. *Experimental gerontology* 42, 719-732.
- Johansson-Lindbom, B., and Agace, W.W.** (2007). Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa. *Immunol Rev* 215, 226-242.
- Kagnoff, M.F.** (2007). Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *J Clin Invest* 117, 41-49.
- Kawai, T., and Akira, S.** (2008). Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* 1143, 1-20.
- Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., Ueno, H., Nakagawa, R., Sato, H., Kondo, E., et al.** (1997). CD1d-restricted and TCR-mediated activation of  $\alpha$ 14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278, 1626-1629.
- Kiessling, R., Klein, E., Pross, H., and Wigzell, H.** (1975). "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* 5, 117-121.
- Kikly, K., Liu, L., Na, S., and Sedgwick, J.D.** (2006). The IL-23/Th(17) axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr Opin Immunol* 18, 670-675.
- Kilshaw, P.J., and Murant, S.J.** (1990). A new surface antigen on intraepithelial lymphocytes in the intestine. *Eur J Immunol* 20, 2201-2207.

## 8.- REFERENCIAS

---

- Kim, H.J., Hwang, S.J., Kim, B.K., Jung, K.C., and Chung, D.H.** (2006a). 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* 118, 101-111.
- Kim, H.S., Colgan, S.P., Pitman, R., Hershberg, R.M., and Blumberg, R.S.** (2000). Human CD1d associates with prolyl-4-hydroxylase during its biosynthesis. *Mol Immunol* 37, 861-868.
- Kim, H.S., Garcia, J., Exley, M., Johnson, K.W., Balk, S.P., and Blumberg, R.S.** (1999). Biochemical characterization of CD1d expression in the absence of beta2-microglobulin. *J Biol Chem* 274, 9289-9295.
- Kim, M.Y., Toellner, K.M., White, A., McConnell, F.M., Gaspal, F.M., Parnell, S.M., Jenkinson, E., Anderson, G., and Lane, P.J.** (2006b). Neonatal and adult CD4+ CD3- cells share similar gene expression profile, and neonatal cells up-regulate OX40 ligand in response to TL1A (TNFSF15). *J Immunol* 177, 3074-3081.
- Kinjo, Y., Wu, D., Kim, G., Xing, G.W., Poles, M.A., Ho, D.D., Tsuji, M., Kawahara, K., Wong, C.H., and Kronenberg, M.** (2005). Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature* 434, 520-525.
- Kobayashi, S., Yoshida, K., Ward, J.M., Letterio, J.J., Longenecker, G., Yaswen, L., Mittleman, B., Mozes, E., Roberts, A.B., Karlsson, S., et al.** (1999). Beta 2-microglobulin-deficient background ameliorates lethal phenotype of the TGF-beta 1 null mouse. *J Immunol* 163, 4013-4019.
- Kokkonen, J., Holm, K., Karttunen, T.J., and Maki, M.** (2000). Children with untreated food allergy express a relative increment in the density of duodenal gammadelta+ T cells. *Scand J Gastroenterol* 35, 1137-1142.
- Komano, H., Fujiura, Y., Kawaguchi, M., Matsumoto, S., Hashimoto, Y., Obana, S., Mombaerts, P., Tonegawa, S., Yamamoto, H., Itohara, S., et al.** (1995). Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6147-6151.
- Koning, F.** (2005). Celiac disease: caught between a rock and a hard place. *Gastroenterology* 129, 1294-1301.
- Koskinen, O., Collin, P., Lindfors, K., Laurila, K., Maki, M., and Kaukinen, K.** (2010). Usefulness of small-bowel mucosal transglutaminase-2 specific autoantibody deposits in the diagnosis and follow-up of celiac disease. *J Clin Gastroenterol* 44, 483-488.
- Kraal, G., Breel, M., Janse, M., and Bruin, G.** (1986). Langerhans' cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J Exp Med* 163, 981-997.
- Kretschmer, K., Apostolou, I., Hawiger, D., Khazaie, K., Nussenzweig, M.C., and von Boehmer, H.** (2005). Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* 6, 1219-1227.
- Kronenberg, M.** (2005). Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol* 23, 877-900.

- Kunisawa, J., Takahashi, I., and Kiyono, H.** (2007). Intraepithelial lymphocytes: their shared and divergent immunological behaviors in the small and large intestine. *Immunol Rev* 215, 136-153.
- La Cava, A., Van Kaer, L., and Fu Dong, S.** (2006). CD4+CD25+ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators. *Trends Immunol* 27, 322-327.
- Laffont, S., Siddiqui, K.R., and Powrie, F.** (2010). Intestinal inflammation abrogates the tolerogenic properties of MLN CD103+ dendritic cells. *Eur J Immunol* 40, 1877-1883.
- Lahdeaho, M.L., Kaukinen, K., Laurila, K., Vuotikka, P., Koivurova, O.P., Karja-Lahdensuu, T., Marcantonio, A., Adelman, D.C., and Maki, M.** (2014). Glutenase ALV003 Attenuates Gluten-Induced Mucosal Injury in Patients With Celiac Disease. *Gastroenterology* 146, 1649-1658.
- Lakatos, P.L., Fischer, S., Lakatos, L., Gal, I., and Papp, J.** (2006). Current concept on the pathogenesis of inflammatory bowel disease-crosstalk between genetic and microbial factors: pathogenic bacteria and altered bacterial sensing or changes in mucosal integrity take "toll" ? *World journal of gastroenterology : WJG* 12, 1829-1841.
- Lawson, V.** (2012). Turned on by danger: activation of CD1d-restricted invariant natural killer T cells. *Immunology* 137, 20-27.
- Lefrancois, L., Parker, C.M., Olson, S., Muller, W., Wagner, N., Schon, M.P., and Puddington, L.** (1999). The role of beta7 integrins in CD8 T cell trafficking during an antiviral immune response. *J Exp Med* 189, 1631-1638.
- Leishman, A.J., Gapin, L., Capone, M., Palmer, E., MacDonald, H.R., Kronenberg, M., and Cheroutre, H.** (2002). Precursors of functional MHC class I- or class II-restricted CD8alphaalpha(+) T cells are positively selected in the thymus by agonist self-peptides. *Immunity* 16, 355-364.
- Leon, A.J., Garrote, J.A., Blanco-Quiros, A., Calvo, C., Fernandez-Salazar, L., Del Villar, A., Barrera, A., and Arranz, E.** (2006). Interleukin 18 maintains a long-standing inflammation in coeliac disease patients. *Clin Exp Immunol* 146, 479-485.
- Leon, A.J., Gomez, E., Garrote, J.A., and Arranz, E.** (2007). The pattern of cytokine expression determines the degree of mucosal damage. *Gut* 56, 441-443.
- Leon, F.** (2011). Flow cytometry of intestinal intraepithelial lymphocytes in celiac disease. *J Immunol Methods* 363, 177-186.
- Leon, F., Camarero, C., Eiras, P., and Roy, G.** (2004). Specificity of IEL profiling in the diagnosis of celiac disease. *Am J Gastroenterol* 99, 958.
- Leon, F., Eiras, P., Camarero, C., Roldan, E., Sanchez, L., R, R.P., Asensio, A., Bootello, A., and Roy, G.** (2002). [Advances in the diagnosis of celiac disease: anti-transglutaminase antibodies and intestinal intraepithelial lymphocytes]. *Gastroenterol Hepatol* 25, 416-422.
- Leon, F., Roldan, E., Sanchez, L., Camarero, C., Bootello, A., and Roy, G.** (2003). Human small-intestinal epithelium contains functional natural killer lymphocytes. *Gastroenterology* 125, 345-356.

## 8.- REFERENCIAS

---

**Leon, F., Sanchez, L., Camarero, C., and Roy, G.** (2005). Cytokine production by intestinal intraepithelial lymphocyte subsets in celiac disease. *Dig Dis Sci* 50, 593-600.

**Liu, Z., Yadav, P.K., Xu, X., Su, J., Chen, C., Tang, M., Lin, H., Yu, J., Qian, J., Yang, P.C., et al.** (2011). The increased expression of IL-23 in inflammatory bowel disease promotes intraepithelial and lamina propria lymphocyte inflammatory responses and cytotoxicity. *J Leukoc Biol* 89, 597-606.

**Locke, N.R., Stankovic, S., Funda, D.P., and Harrison, L.C.** (2006). TCR gamma delta intraepithelial lymphocytes are required for self-tolerance. *J Immunol* 176, 6553-6559.

**Luciani, A., Vilella, V.R., Vasaturo, A., Giardino, I., Pettoello-Mantovani, M., Guido, S., and al, e.** (2009). Lysosomal accumulation of gliadin p31-43 peptide induces oxidative stress and Tissue Transglutaminase mediated PPAR downregulation in intestinal epithelial cells and coeliac mucosa. . *Gut in press*.

**Luczkowiak, J., Sattin, S., Sutkeviciute, I., Reina, J.J., Sanchez-Navarro, M., Thepaut, M., Martinez-Prats, L., Daggetti, A., Fieschi, F., Delgado, R., et al.** (2011). Pseudosaccharide functionalized dendrimers as potent inhibitors of DC-SIGN dependent Ebola pseudotyped viral infection. *Bioconjug Chem* 22, 1354-1365.

**Lundin, K.E., Scott, H., Hansen, T., Paulsen, G., Halstensen, T.S., Fausa, O., Thorsby, E., and Sollid, L.M.** (1993). Gliadin-specific, HLA-DQ(alpha 1\*0501,beta 1\*0201) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. *J Exp Med* 178, 187-196.

**Luster, A.D., Alon, R., and von Andrian, U.H.** (2005). Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 6, 1182-1190.  
**Macdonald, T.T., and Monteleone, G.** (2005). Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* 307, 1920-1925.

**Madakamutil, L.T., Christen, U., Lena, C.J., Wang-Zhu, Y., Attinger, A., Sundarajan, M., Ellmeier, W., von Herrath, M.G., Jensen, P., Littman, D.R., et al.** (2004). CD8alpha-mediated survival and differentiation of CD8 memory T cell precursors. *Science* 304, 590-593.

**Mahnke, K., Qian, Y., Knop, J., and Enk, A.H.** (2003). Induction of CD4+/CD25+ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *Blood* 101, 4862-4869.

**Maiuri, L., Ciacci, C., Auricchio, S., Brown, V., Quaratino, S., and Londei, M.** (2000). Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology* 119, 996-1006.

**Maiuri, L., Ciacci, C., Ricciardelli, I., Vacca, L., Raia, V., Auricchio, S., Picard, J., Osman, M., Quaratino, S., and Londei, M.** (2003). Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet* 362, 30-37.

**Maloy, K.J., and Powrie, F.** (2011). Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* 474, 298-306.

- Mann, E.R., Landy, J.D., Bernardo, D., Peake, S.T., Hart, A.L., Al-Hassi, H.O., and Knight, S.C.** (2013). Intestinal dendritic cells: their role in intestinal inflammation, manipulation by the gut microbiota and differences between mice and men. *Immunol Lett* 150, 30-40.
- Marin, M.L., Greenstein, A.J., Geller, S.A., Gordon, R.E., and Aufses, A.H., Jr.** (1984). Freeze-fracture analysis of epithelial cell lysosomal inclusions in Crohn's disease. *Ultrastructural pathology* 6, 39-44.
- Marsh, M.N.** (1989a). The immunopathology of the small intestinal reaction in gluten-sensitivity. *Immunological investigations* 18, 509-531.
- Marsh, M.N.** (1989b). Studies of intestinal lymphoid tissue. XV. Histopathologic features suggestive of cell-mediated reactivity in jejunal mucosae of patients with dermatitis herpetiformis. *Virchows Archiv A, Pathological anatomy and histopathology* 416, 125-132.
- Marsh, M.N., Bjarnason, I., Shaw, J., Ellis, A., Baker, R., and Peters, T.J.** (1990). Studies of intestinal lymphoid tissue. XIV--HLA status, mucosal morphology, permeability and epithelial lymphocyte populations in first degree relatives of patients with coeliac disease. *Gut* 31, 32-36.
- Marth, J.D., and Grewal, P.K.** (2008). Mammalian glycosylation in immunity. *Nat Rev Immunol* 8, 874-887.
- Martucci, S., Fraser, J.S., Biagi, F., Corazza, G.R., Ciclitira, P.J., and Ellis, H.J.** (2003). Characterizing one of the DQ2 candidate epitopes in coeliac disease: A-gliadin 51-70 toxicity assessed using an organ culture system. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 15, 1293-1298.
- Matsuoka, K., Inoue, N., Sato, T., Okamoto, S., Hisamatsu, T., Kishi, Y., Sakuraba, A., Hitotsumatsu, O., Ogata, H., Koganei, K., et al.** (2004). T-bet upregulation and subsequent interleukin 12 stimulation are essential for induction of Th1 mediated immunopathology in Crohn's disease. *Gut* 53, 1303-1308.
- Matteoli, G., Mazzini, E., Iliev, I.D., Mileti, E., Fallarino, F., Puccetti, P., Chieppa, M., and Rescigno, M.** (2010). Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. *Gut* 59, 595-604.
- Matysiak-Budnik, T., Candalh, C., Dugave, C., Namane, A., Cellier, C., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M.** (2003). Alterations of the intestinal transport and processing of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology* 125, 696-707.
- Maynard, C.L., Elson, C.O., Hatton, R.D., and Weaver, C.T.** (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* 489, 231-241.
- Mebius, R.E., Rennert, P., and Weissman, I.L.** (1997). Developing lymph nodes collect CD4+CD3- LTbeta+ cells that can differentiate to APC, NK cells, and follicular cells but not T or B cells. *Immunity* 7, 493-504.

## 8.- REFERENCIAS

---

- Menon, S., Rosenberg, K., Graham, S.A., Ward, E.M., Taylor, M.E., Drickamer, K., and Leckband, D.E.** (2009). Binding-site geometry and flexibility in DC-SIGN demonstrated with surface force measurements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 11524-11529.
- Mention, J.J., Ben Ahmed, M., Begue, B., Barbe, U., Verkarre, V., Asnafi, V., Colombel, J.F., Cugnenc, P.H., Ruemmele, F.M., McIntyre, E., et al.** (2003). Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology* 125, 730-745.
- Meresse, B., Chen, Z., Ciszewski, C., Tretiakova, M., Bhagat, G., Krausz, T.N., Raulet, D.H., Lanier, L.L., Groh, V., Spies, T., et al.** (2004). Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity* 21, 357-366.
- Meresse, B., Curran, S.A., Ciszewski, C., Orbelyan, G., Setty, M., Bhagat, G., Lee, L., Tretiakova, M., Semrad, C., Kistner, E., et al.** (2006). Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease. *J Exp Med* 203, 1343-1355.
- Meresse, B., Malamut, G., and Cerf-Bensussan, N.** (2012). Celiac disease: an immunological jigsaw. *Immunity* 36, 907-919.
- Meresse, B., Ripoche, J., Heyman, M., and Cerf-Bensussan, N.** (2009). Celiac disease: from oral tolerance to intestinal inflammation, autoimmunity and lymphomagenesis. *Mucosal Immunol* 2, 8-23.
- Michel, M.L., Keller, A.C., Paget, C., Fujio, M., Trottein, F., Savage, P.B., Wong, C.H., Schneider, E., Dy, M., and Leite-de-Moraes, M.C.** (2007). Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Med* 204, 995-1001.
- Middendorp, S., and Nieuwenhuis, E.E.** (2009). NKT cells in mucosal immunity. *Mucosal Immunol* 2, 393-402.
- Miyamoto, K., Miyake, S., and Yamamura, T.** (2001). A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature* 413, 531-534.
- Molberg, O., McAdam, S.N., Korner, R., Quarsten, H., Kristiansen, C., Madsen, L., Fugger, L., Scott, H., Noren, O., Roepstorff, P., et al.** (1998). Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med* 4, 713-717.
- Monteleone, G., Fina, D., Caruso, R., and Pallone, F.** (2006). New mediators of immunity and inflammation in inflammatory bowel disease. *Current opinion in gastroenterology* 22, 361-364.
- Monteleone, G., Pender, S.L., Alstead, E., Hauer, A.C., Lionetti, P., McKenzie, C., and MacDonald, T.T.** (2001). Role of interferon alpha in promoting T helper cell type 1 responses in the small intestine in coeliac disease. *Gut* 48, 425-429.
- Monticelli, L.A., Sonnenberg, G.F., Abt, M.C., Alenghat, T., Ziegler, C.G., Doering, T.A., Angelosanto, J.M., Laidlaw, B.J., Yang, C.Y., Sathaliyawala, T., et al.** (2011). Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. *Nat Immunol* 12, 1045-1054.

- Mora, J.R.** (2008). Homing imprinting and immunomodulation in the gut: role of dendritic cells and retinoids. *Inflamm Bowel Dis* 14, 275-289.
- Mora, J.R., Iwata, M., Eksteen, B., Song, S.Y., Junt, T., Senman, B., Otipoby, K.L., Yokota, A., Takeuchi, H., Ricciardi-Castagnoli, P., et al.** (2006). Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science* 314, 1157-1160.
- Morgan, M.E., van Bilsen, J.H., Bakker, A.M., Heemskerk, B., Schilham, M.W., Hartgers, F.C., Elferink, B.G., van der Zanden, L., de Vries, R.R., Huizinga, T.W., et al.** (2005). Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum Immunol* 66, 13-20.
- Moro, K., Yamada, T., Tanabe, M., Takeuchi, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., Furusawa, J., Ohtani, M., Fujii, H., and Koyasu, S.** (2010). Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature* 463, 540-544.
- Mowat, A.M.** (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 3, 331-341.
- Mowat, A.M., and Bain, C.C.** (2011). Mucosal macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Journal of innate immunity* 3, 550-564.
- Mudter, J., Weigmann, B., Bartsch, B., Kiesslich, R., Strand, D., Galle, P.R., Lehr, H.A., Schmidt, J., and Neurath, M.F.** (2005). Activation pattern of signal transducers and activators of transcription (STAT) factors in inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 100, 64-72.
- Murray, J.A., and Green, P.H.** (1999). Biopsy is the gold standard of diagnosis of celiac sprue. *Gastroenterology* 116, 1273-1274.
- Nakache, M., Berg, E.L., Streeter, P.R., and Butcher, E.C.** (1989). The mucosal vascular addressin is a tissue-specific endothelial cell adhesion molecule for circulating lymphocytes. *Nature* 337, 179-181.
- Nakamura, R.M., Matsutani, M., and Barry, M.** (2003). Advances in clinical laboratory tests for inflammatory bowel disease. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 335, 9-20.
- Nanayakkara, M., Lania, G., Maglio, M., Discepolo, V., Sarno, M., Gaito, A., Troncone, R., Auricchio, S., Auricchio, R., and Barone, M.V.** (2013). An undigested gliadin peptide activates innate immunity and proliferative signaling in enterocytes: the role in celiac disease. *Am J Clin Nutr* 98, 1123-1135.
- Neurath, M.F., Finotto, S., and Glimcher, L.H.** (2002). The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* 8, 567-573.
- Newman, B., and Siminovitch, K.A.** (2005). Recent advances in the genetics of inflammatory bowel disease. *Current opinion in gastroenterology* 21, 401-407.
- Niess, J.H., and Adler, G.** (2010). Enteric flora expands gut lamina propria CX3CR1+ dendritic cells supporting inflammatory immune responses under normal and inflammatory conditions. *J Immunol* 184, 2026-2037.

## 8.- REFERENCIAS

---

- Nieuwenhuis, E.E., Matsumoto, T., Lindenberg, D., Willemsen, R., Kaser, A., Simons-Oosterhuis, Y., Brugman, S., Yamaguchi, K., Ishikawa, H., Aiba, Y., et al.** (2009). Cd1d-dependent regulation of bacterial colonization in the intestine of mice. *J Clin Invest* 119, 1241-1250.
- Nilsen, E.M., Lundin, K.E., Krajci, P., Scott, H., Sollid, L.M., and Brandtzaeg, P.** (1995). Gluten specific, HLA-DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon gamma. *Gut* 37, 766-776.
- O'Garra, A., and Vieira, P.** (2007). T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol* 7, 425-428.
- O'Keefe, J., Doherty, D.G., Kenna, T., Sheahan, K., O'Donoghue, D.P., Hyland, J.M., and O'Farrelly, C.** (2004). Diverse populations of T cells with NK cell receptors accumulate in the human intestine in health and in colorectal cancer. *Eur J Immunol* 34, 2110-2119.
- Oberhuber, G., Kastner, N., and Stolte, M.** (1997). Giardiasis: a histologic analysis of 567 cases. *Scand J Gastroenterol* 32, 48-51.
- Olaussen, R.W., Johansen, F.E., Lundin, K.E., Jahnsen, J., Brandtzaeg, P., and Farstad, I.N.** (2002). Interferon-gamma-secreting T cells localize to the epithelium in coeliac disease. *Scand J Immunol* 56, 652-664.
- Pabst, O., and Bernhardt, G.** (2010). The puzzle of intestinal lamina propria dendritic cells and macrophages. *Eur J Immunol* 40, 2107-2111.
- Page, M.J., Poritz, L.S., Tilberg, A.F., Zhang, W.J., Chorney, M.J., and Koltun, W.A.** (2000). Cd1d-restricted cellular lysis by peripheral blood lymphocytes: relevance to the inflammatory bowel diseases. *The Journal of surgical research* 92, 214-221.
- Palucka, K., and Banchereau, J.** (2002). How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. *Curr Opin Immunol* 14, 420-431.
- Panja, A., Blumberg, R.S., Balk, S.P., and Mayer, L.** (1993). CD1d is involved in T cell-intestinal epithelial cell interactions. *J Exp Med* 178, 1115-1119.
- Paterson, B.M., Lammers, K.M., Arrieta, M.C., Fasano, A., and Meddings, J.B.** (2007). The safety, tolerance, pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of single doses of AT-1001 in coeliac disease subjects: a proof of concept study. *Aliment Pharmacol Ther* 26, 757-766.
- Peaper, D.R., and Cresswell, P.** (2008). Regulation of MHC class I assembly and peptide binding. *Annual review of cell and developmental biology* 24, 343-368.
- Pearson, C., Uhlig, H.H., and Powrie, F.** (2012). Lymphoid microenvironments and innate lymphoid cells in the gut. *Trends Immunol* 33, 289-296.
- Pellicci, D.G., Hammond, K.J., Coquet, J., Kyparissoudis, K., Brooks, A.G., Kedzierska, K., Keating, R., Turner, S., Berzins, S., Smyth, M.J., et al.** (2005). DX5/CD49b-positive T cells are not synonymous with CD1d-dependent NKT cells. *J Immunol* 175, 4416-4425.
- Pena, A.S.** (2006). Contribution of genetics to a new vision in the understanding of inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology : WJG* 12, 4784-4787.

- Peralbo, E., DelaRosa, O., Gayoso, I., Pita, M.L., Tarazona, R., and Solana, R.** (2006). Decreased frequency and proliferative response of invariant Valpha24Vbeta11 natural killer T (iNKT) cells in healthy elderly. *Biogerontology* 7, 483-492.
- Perera, L., Shao, L., Patel, A., Evans, K., Meresse, B., Blumberg, R., Geraghty, D., Groh, V., Spies, T., Jabri, B., et al.** (2007). Expression of nonclassical class I molecules by intestinal epithelial cells. *Inflamm Bowel Dis* 13, 298-307.
- Persson, E.K., Scott, C.L., Mowat, A.M., and Agace, W.W.** (2013). Dendritic cell subsets in the intestinal lamina propria: ontogeny and function. *Eur J Immunol* 43, 3098-3107.
- Peterson, L.W., and Artis, D.** (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 14, 141-153.
- Pillai, V., Ortega, S.B., Wang, C.K., and Karandikar, N.J.** (2007). Transient regulatory T-cells: a state attained by all activated human T-cells. *Clin Immunol* 123, 18-29.
- Popp, M.W., Antos, J.M., Grotenbreg, G.M., Spooner, E., and Ploegh, H.L.** (2007). Sortagging: a versatile method for protein labeling. *Nature chemical biology* 3, 707-708.
- Prasad, K.K., Thapa, B.R., Nain, C.K., and Singh, K.** (2009). Assessment of the diagnostic value of duodenal bulb histology in patients with celiac disease, using multiple biopsy sites. *J Clin Gastroenterol* 43, 307-311.
- Proft, T.** (2010). Sortase-mediated protein ligation: an emerging biotechnology tool for protein modification and immobilisation. *Biotechnol Lett* 32, 1-10.
- Pyle, G.G., Paaso, B., Anderson, B.E., Allen, D.D., Marti, T., Li, Q., Siegel, M., Khosla, C., and Gray, G.M.** (2005). Effect of pretreatment of food gluten with prolyl endopeptidase on gluten-induced malabsorption in celiac sprue. *Clin Gastroenterol Hepatol* 3, 687-694.
- Qiao, S.W., Bergseng, E., Molberg, O., Xia, J., Fleckenstein, B., Khosla, C., and Sollid, L.M.** (2004). Antigen presentation to celiac lesion-derived T cells of a 33-mer gliadin peptide naturally formed by gastrointestinal digestion. *J Immunol* 173, 1757-1762.
- Qiao, S.W., Iversen, R., Raki, M., and Sollid, L.M.** The adaptive immune response in celiac disease. *Semin Immunopathol* 34, 523-540.
- Qiao, S.W., Iversen, R., Raki, M., and Sollid, L.M.** (2012). The adaptive immune response in celiac disease. *Semin Immunopathol* 34, 523-540.
- Rabinovich, G.A., and Croci, D.O.** (2012). Regulatory circuits mediated by lectin-glycan interactions in autoimmunity and cancer. *Immunity* 36, 322-335.
- Reschner, A., Hubert, P., Delvenne, P., Boniver, J., and Jacobs, N.** (2008). Innate lymphocyte and dendritic cell cross-talk: a key factor in the regulation of the immune response. *Clin Exp Immunol* 152, 219-226.

## 8.- REFERENCIAS

---

- Rescigno, M.** (2009). Before they were gut dendritic cells. *Immunity* 31, 454-456.
- Rescigno, M.** (2010a). Dendritic cells in tolerance induction for the treatment of autoimmune diseases. *Eur J Immunol* 40, 2119-2123.
- Rescigno, M.** (2010b). Intestinal dendritic cells. *Adv Immunol* 107, 109-138.
- Rescigno, M.** (2011). The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. *Trends Immunol* 32, 256-264.
- Rescigno, M.** (2014). Dendritic cell-epithelial cell crosstalk in the gut. *Immunol Rev* 260, 118-128.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P., and Ricciardi-Castagnoli, P.** (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2, 361-367.
- Ribes-Koninckx, C., Mearin, M.L., Korponay-Szabo, I.R., Shamir, R., Husby, S., Ventura, A., Branski, D., Catassi, C., Koletzko, S., Maki, M., et al.** (2012). Coeliac disease diagnosis: ESPGHAN 1990 criteria or need for a change? Results of a questionnaire. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 54, 15-19.
- Rimoldi, M., Chieppa, M., Salucci, V., Avogadri, F., Sonzogni, A., Sampietro, G.M., Nespoli, A., Viale, G., Allavena, P., and Rescigno, M.** (2005). Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 6, 507-514.
- Rodrigo, L.** (2009). Investigational therapies for celiac disease. *Expert opinion on investigational drugs* 18, 1865-1873.
- Ronet, C., Darche, S., Leite de Moraes, M., Miyake, S., Yamamura, T., Louis, J.A., Kasper, L.H., and Buzoni-Gatel, D.** (2005). NKT cells are critical for the initiation of an inflammatory bowel response against *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 175, 899-908.
- Rothlin, C.V., Leighton, J.A., and Ghosh, S.** (2014). Tyro3, Axl, and MerTK Receptor Signaling in Inflammatory Bowel Disease and Colitis-associated Cancer. *Inflamm Bowel Dis*.
- Sakaguchi, S.** (2004). Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22, 531-562.
- Sancho, D., Mourao-Sa, D., Joffre, O.P., Schulz, O., Rogers, N.C., Pennington, D.J., Carlyle, J.R., and Reis e Sousa, C.** (2008). Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *J Clin Invest* 118, 2098-2110.
- Sarra, M., Cupi, M.L., Monteleone, I., Franze, E., Ronchetti, G., Di Sabatino, A., Gentileschi, P., Franceschilli, L., Sileri, P., Sica, G., et al.** (2013). IL-15 positively regulates IL-21 production in celiac disease mucosa. *Mucosal Immunol* 6, 244-255.
- Sattin, S., Daghetti, A., Thepaut, M., Berzi, A., Sanchez-Navarro, M., Tabarani, G., Rojo, J., Fieschi, F., Clerici, M., and Bernardi, A.** (2010). Inhibition of DC-SIGN-mediated HIV infection by a linear trimannoside mimic in a tetravalent presentation. *ACS chemical biology* 5, 301-312.

- Savilahti, E., Ormala, T., Arato, A., Hacsek, G., Holm, K., Klemola, T., Nemeth, A., Maki, M., and Reunala, T.** (1997). Density of gamma/delta+ T cells in the jejunal epithelium of patients with coeliac disease and dermatitis herpetiformis is increased with age. *Clin Exp Immunol* 109, 464-467.
- Scandella, E., Bolinger, B., Lattmann, E., Miller, S., Favre, S., Littman, D.R., Finke, D., Luther, S.A., Junt, T., and Ludewig, B.** (2008). Restoration of lymphoid organ integrity through the interaction of lymphoid tissue-inducer cells with stroma of the T cell zone. *Nat Immunol* 9, 667-675.
- Schaefer, J.S., Montufar-Solis, D., Vigneswaran, N., and Klein, J.R.** (2010). ICOS promotes IL-17 synthesis in colonic intraepithelial lymphocytes in IL-10-/- mice. *J Leukoc Biol* 87, 301-308.
- Schreibelt, G., Klinkenberg, L.J., Cruz, L.J., Tacke, P.J., Tel, J., Kreutz, M., Adema, G.J., Brown, G.D., Figdor, C.G., and de Vries, I.J.** (2012). The C-type lectin receptor CLEC9A mediates antigen uptake and (cross-)presentation by human blood BDCA3+ myeloid dendritic cells. *Blood* 119, 2284-2292.
- Schulz, O., Jaensson, E., Persson, E.K., Liu, X., Worbs, T., Agace, W.W., and Pabst, O.** (2009). Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *J Exp Med* 206, 3101-3114.
- Schuppan, D., Junker, Y., and Barisani, D.** (2009). Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterology* 137, 1912-1933.
- Seitz, H.K., Egerer, G., Oneta, C., Kramer, S., Sieg, A., Klee, F., and Simanowski, U.A.** (1996). Alcohol dehydrogenase in the human colon and rectum. *Digestion* 57, 105-108.
- Shan, L., Molberg, O., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G.M., Sollid, L.M., and Khosla, C.** (2002). Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* 297, 2275-2279.
- Shevach, E.M., McHugh, R.S., Piccirillo, C.A., and Thornton, A.M.** (2001). Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol Rev* 182, 58-67.
- Shewry, P.R., and Halford, N.G.** (2003). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in the grain utilization. *J Exp Bot* 53, 947-958.
- Shires, J., Theodoridis, E., and Hayday, A.C.** (2001). Biological insights into TCRgamma/delta+ and TCRalpha/beta+ intraepithelial lymphocytes provided by serial analysis of gene expression (SAGE). *Immunity* 15, 419-434.
- Shortman, K., and Liu, Y.J.** (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2, 151-161.
- Simren, M., Stotzer, P.O., Sjovall, H., Abrahamsson, H., and Bjornsson, E.S.** (2003). Abnormal levels of neuropeptide Y and peptide YY in the colon in irritable bowel syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 15, 55-62.
- Singer, A., Adoro, S., and Park, J.H.** (2008). Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat Rev Immunol* 8, 788-801.

## 8.- REFERENCIAS

---

- Singh, S.K., Stephani, J., Schaefer, M., Kalay, H., Garcia-Vallejo, J.J., den Haan, J., Saeland, E., Sparwasser, T., and van Kooyk, Y.** (2009). Targeting glycan modified OVA to murine DC-SIGN transgenic dendritic cells enhances MHC class I and II presentation. *Mol Immunol* 47, 164-174.
- Sjostrom, H., Lundin, K.E., Molberg, O., Korner, R., McAdam, S.N., Anthonsen, D., Quarsten, H., Noren, O., Roepstorff, P., Thorsby, E., et al.** (1998). Identification of a gliadin T-cell epitope in coeliac disease: general importance of gliadin deamidation for intestinal T-cell recognition. *Scand J Immunol* 48, 111-115.
- Smyth, D.J., Plagnol, V., Walker, N.M., Cooper, J.D., Downes, K., Yang, J.H., Howson, J.M., Stevens, H., McManus, R., Wijmenga, C., et al.** (2008). Shared and distinct genetic variants in type 1 diabetes and celiac disease. *N Engl J Med* 359, 2767-2777.
- Sollid, L.M.** (2002). Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol* 2, 647-655.
- Sollid, L.M., and Khosla, C.** (2011). Novel therapies for coeliac disease. *J Intern Med* 269, 604-613.
- Sollid, L.M., and Lie, B.A.** (2005). Celiac disease genetics: current concepts and practical applications. *Clin Gastroenterol Hepatol* 3, 843-851.
- Sollid, L.M., Qiao, S.W., Anderson, R.P., Gianfrani, C., and Koning, F.** (2012). Nomenclature and listing of celiac disease relevant gluten T-cell epitopes restricted by HLA-DQ molecules. *Immunogenetics* 64, 455-460.
- Sollid, L.M., and Thorsby, E.** (1993). HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology* 105, 910-922.
- Somnay-Wadgaonkar, K., Nusrat, A., Kim, H.S., Canchis, W.P., Balk, S.P., Colgan, S.P., and Blumberg, R.S.** (1999). Immunolocalization of CD1d in human intestinal epithelial cells and identification of a beta2-microglobulin-associated form. *Int Immunol* 11, 383-392.
- Sonnenberg, G.F., Monticelli, L.A., Alenghat, T., Fung, T.C., Hutnick, N.A., Kunisawa, J., Shibata, N., Grunberg, S., Sinha, R., Zahm, A.M., et al.** (2012). Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria. *Science* 336, 1321-1325.
- Spencer, J., Isaacson, P.G., MacDonald, T.T., Thomas, A.J., and Walker-Smith, J.A.** (1991). Gamma/delta T cells and the diagnosis of coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 85, 109-113.
- Spencer, J., MacDonald, T.T., Diss, T.C., Walker-Smith, J.A., Ciclitira, P.J., and Isaacson, P.G.** (1989). Changes in intraepithelial lymphocyte subpopulations in coeliac disease and enteropathy associated T cell lymphoma (malignant histiocytosis of the intestine). *Gut* 30, 339-346.
- Sperandio, M., Gleissner, C.A., and Ley, K.** (2009). Glycosylation in immune cell trafficking. *Immunol Rev* 230, 97-113.

- Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N., Mebius, R.E., et al.** (2013). Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* 13, 145-149.
- Spits, H., and Cupedo, T.** (2012). Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. *Annu Rev Immunol* 30, 647-675.
- Spits, H., and Di Santo, J.P.** (2011). The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat Immunol* 12, 21-27.
- Staton, T.L., Habtezion, A., Winslow, M.M., Sato, T., Love, P.E., and Butcher, E.C.** (2006). CD8+ recent thymic emigrants home to and efficiently repopulate the small intestine epithelium. *Nat Immunol* 7, 482-488.
- Steinman, R.M., Hawiger, D., and Nussenzweig, M.C.** (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21, 685-711.
- Stepniak, D., and Koning, F.** (2006). Celiac disease--sandwiched between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol* 67, 460-468.
- Strober, W.** (2008). Vitamin A rewrites the ABCs of oral tolerance. *Mucosal Immunol* 1, 92-95.
- Stromholm, T., Saether, O.D., Aadahl, P., Nilsen, G., Kvaerness, J., and Myhre, H.O.** (1995). Alterations in intracranial volume following cross-clamping of the descending thoracic aorta in pigs--an experimental study using MRI. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 10, 36-39.
- Sun, C.M., Hall, J.A., Blank, R.B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J.R., and Belkaid, Y.** (2007). Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 204, 1775-1785.
- Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H.** (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655-669.
- Tang, F., Chen, Z., Ciszewski, C., Setty, M., Solus, J., Tretiakova, M., Ebert, E., Han, J., Lin, A., Guandalini, S., et al.** (2009). Cytosolic PLA2 is required for CTL-mediated immunopathology of celiac disease via NKG2D and IL-15. *J Exp Med* 206, 707-719.
- Targan, S.R., and Karp, L.C.** (2005). Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis. *Immunol Rev* 206, 296-305.
- Thyberg, J., Graf, W., and Klingenstrom, P.** (1981). Intestinal fine structure in Crohn's disease. Lysosomal inclusions in epithelial cells and macrophages. *Virchows Archiv A, Pathological anatomy and histology* 391, 141-152.
- Treiner, E., and Lantz, O.** (2006). CD1d- and MR1-restricted invariant T cells: of mice and men. *Curr Opin Immunol* 18, 519-526.
- Trier, J.S.** (1998). Diagnosis of celiac sprue. *Gastroenterology* 115, 211-216.

## 8.- REFERENCIAS

---

- Trop, S., Samsonov, D., Gotsman, I., Alper, R., Diment, J., and Ilan, Y.** (1999). Liver-associated lymphocytes expressing NK1.1 are essential for oral immune tolerance induction in a murine model. *Hepatology* 29, 746-755.
- Tsukiji, S., and Nagamune, T.** (2009). Sortase-mediated ligation: a gift from Gram-positive bacteria to protein engineering. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 10, 787-798.
- Tupin, E., Kinjo, Y., and Kronenberg, M.** (2007). The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. *Nature reviews Microbiology* 5, 405-417.
- Ueno, H., Klechevsky, E., Morita, R., Aspod, C., Cao, T., Matsui, T., Di Pucchio, T., Connolly, J., Fay, J.W., Pascual, V., et al.** (2007). Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev* 219, 118-142.
- Uhlig, H.H., McKenzie, B.S., Hue, S., Thompson, C., Joyce-Shaikh, B., Stepankova, R., Robinson, N., Buonocore, S., Tlaskalova-Hogenova, H., Cua, D.J., et al.** (2006). Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology. *Immunity* 25, 309-318.
- Unger, W.W., van Beelen, A.J., Bruijns, S.C., Joshi, M., Fehres, C.M., van Bloois, L., Verstege, M.I., Ambrosini, M., Kalay, H., Nazmi, K., et al.** (2012). Glycan-modified liposomes boost CD4+ and CD8+ T-cell responses by targeting DC-SIGN on dendritic cells. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 160, 88-95.
- Vader, W., Kooy, Y., Van Veelen, P., De Ru, A., Harris, D., Benckhuijsen, W., Pena, S., Mearin, L., Drijfhout, J.W., and Koning, F.** (2002). The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides. *Gastroenterology* 122, 1729-1737.
- Vallejo-Diez, S., Bernardo, D., Moreno Mde, L., Munoz-Suano, A., Fernandez-Salazar, L., Calvo, C., Sousa, C., Garrote, J.A., Cebolla, A., and Arranz, E.** (2013). Detection of specific IgA antibodies against a novel deamidated 8-Mer gliadin peptide in blood plasma samples from celiac patients. *PLoS One* 8, e80982.
- van de Wal, Y., Kooy, Y., van Veelen, P., Pena, S., Mearin, L., Papadopoulos, G., and Koning, F.** (1998). Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *J Immunol* 161, 1585-1588.
- van der Vliet, H.J., Molling, J.W., von Blomberg, B.M., Nishi, N., Kolgen, W., van den Eertwegh, A.J., Pinedo, H.M., Giaccone, G., and Scheper, R.J.** (2004). The immunoregulatory role of CD1d-restricted natural killer T cells in disease. *Clin Immunol* 112, 8-23.
- van der Vliet, H.J., von Blomberg, B.M., Nishi, N., Reijm, M., Voskuyl, A.E., van Bodegraven, A.A., Polman, C.H., Rustemeyer, T., Lips, P., van den Eertwegh, A.J., et al.** (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* 100, 144-148.
- van Dieren, J.M., van der Woude, C.J., Kuipers, E.J., Escher, J.C., Samsom, J.N., Blumberg, R.S., and Nieuwenhuis, E.E.** (2007). Roles of CD1d-restricted NKT cells in the intestine. *Inflamm Bowel Dis* 13, 1146-1152.

- van Heel, D.A., Franke, L., Hunt, K.A., Gwilliam, R., Zhernakova, A., Inouye, M., Wapenaar, M.C., Barnardo, M.C., Bethel, G., Holmes, G.K., et al.** (2007). A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nat Genet* 39, 827-829.
- Van Kaer, L.** (2007). NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. *Curr Opin Immunol* 19, 354-364.
- Van Kaer, L., Parekh, V.V., and Wu, L.** (2011). Invariant natural killer T cells: bridging innate and adaptive immunity. *Cell and tissue research* 343, 43-55.
- van Kooyk, Y., and Rabinovich, G.A.** (2008). Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* 9, 593-601.
- van Liempt, E., Bank, C.M., Mehta, P., Garcia-Vallejo, J.J., Kwar, Z.S., Geyer, R., Alvarez, R.A., Cummings, R.D., Kooyk, Y., and van Die, I.** (2006). Specificity of DC-SIGN for mannose- and fucose-containing glycans. *FEBS Lett* 580, 6123-6131.
- van Vliet, S.J., den Dunnen, J., Gringhuis, S.I., Geijtenbeek, T.B., and van Kooyk, Y.** (2007). Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity. *Curr Opin Immunol* 19, 435-440.
- Veldhoen, M., and Withers, D.R.** (2010). Immunology. Innate lymphoid cell relations. *Science* 330, 594-595.
- Vermeire, S., Van Assche, G., and Rutgeerts, P.** (2012). Classification of inflammatory bowel disease: the old and the new. *Current opinion in gastroenterology* 28, 321-326.
- Wagner, N., Lohler, J., Tedder, T.F., Rajewsky, K., Muller, W., and Steeber, D.A.** (1998). L-selectin and beta7 integrin synergistically mediate lymphocyte migration to mesenteric lymph nodes. *Eur J Immunol* 28, 3832-3839.
- Wang, J., Zou, Z.H., Xia, H.L., He, J.X., Zhong, N.S., and Tao, A.L.** (2012). Strengths and weaknesses of immunotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of 12 randomized controlled trials. *PLoS One* 7, e32695.
- Weinstein, W.M., Saunders, D.R., Tytgat, G.N., and Rubin, C.E.** (1970). Collagenous sprue--an unrecognized type of malabsorption. *N Engl J Med* 283, 1297-1301.
- Wieland Brown, L.C., Penaranda, C., Kashyap, P.C., Williams, B.B., Clardy, J., Kronenberg, M., Sonnenburg, J.L., Comstock, L.E., Bluestone, J.A., and Fischbach, M.A.** (2013). Production of alpha-galactosylceramide by a prominent member of the human gut microbiota. *PLoS biology* 11, e1001610.
- Wingender, G., and Kronenberg, M.** (2008). 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* 294, G1-8.
- Wittig, B.M., and Zeitz, M.** (2003). The gut as an organ of immunology. *Int J Colorectal Dis* 18, 181-187.

## 8.- REFERENCIAS

---

- Wong, S.H., Walker, J.A., Jolin, H.E., Drynan, L.F., Hams, E., Camelo, A., Barlow, J.L., Neill, D.R., Panova, V., Koch, U., et al.** (2012). Transcription factor RORalpha is critical for nuocyte development. *Nat Immunol* 13, 229-236.
- Worbs, T., Bode, U., Yan, S., Hoffmann, M.W., Hintzen, G., Bernhardt, G., Forster, R., and Pabst, O.** (2006). Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med* 203, 519-527.
- Wurbel, M.A., Philippe, J.M., Nguyen, C., Victorero, G., Freeman, T., Wooding, P., Miazek, A., Mattei, M.G., Malissen, M., Jordan, B.R., et al.** (2000). The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9. *Eur J Immunol* 30, 262-271.
- Xavier, R.J., and Podolsky, D.K.** (2007). Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 448, 427-434.
- Xiao, S., Jin, H., Korn, T., Liu, S.M., Oukka, M., Lim, B., and Kuchroo, V.K.** (2008). Retinoic acid increases Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF-beta-driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression. *J Immunol* 181, 2277-2284.
- Yamagata, T., Mathis, D., and Benoist, C.** (2004). Self-reactivity in thymic double-positive cells commits cells to a CD8 alpha alpha lineage with characteristics of innate immune cells. *Nat Immunol* 5, 597-605.
- Yamauchi, M., Morikawa, T., Kuchiba, A., Imamura, Y., Qian, Z.R., Nishihara, R., Liao, X., Waldron, L., Hoshida, Y., Huttenhower, C., et al.** (2012). Assessment of colorectal cancer molecular features along bowel subsites challenges the conception of distinct dichotomy of proximal versus distal colorectum. *Gut* 61, 847-854.
- Yang, Q., Saenz, S.A., Zlotoff, D.A., Artis, D., and Bhandoola, A.** (2011). Cutting edge: Natural helper cells derive from lymphoid progenitors. *J Immunol* 187, 5505-5509.
- Yang, Z., Mu, Z., Dabovic, B., Jurukovski, V., Yu, D., Sung, J., Xiong, X., and Munger, J.S.** (2007). Absence of integrin-mediated TGFbeta1 activation in vivo recapitulates the phenotype of TGFbeta1-null mice. *J Cell Biol* 176, 787-793.
- Yu, K.O., and Porcelli, S.A.** (2005). The diverse functions of CD1d-restricted NKT cells and their potential for immunotherapy. *Immunol Lett* 100, 42-55.
- Zabel, B.A., Agace, W.W., Campbell, J.J., Heath, H.M., Parent, D., Roberts, A.I., Ebert, E.C., Kassam, N., Qin, S., Zovko, M., et al.** (1999). Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis. *J Exp Med* 190, 1241-1256.
- Zeng, Z., Castano, A.R., Segelke, B.W., Stura, E.A., Peterson, P.A., and Wilson, I.A.** (1997). Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. *Science* 277, 339-345.
- Zheng, Y., and Rudensky, A.Y.** (2007). Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol* 8, 457-462.

**Zhou, D., Mattner, J., Cantu, C., 3rd, Schrantz, N., Yin, N., Gao, Y., Sagiv, Y., Hudspeth, K., Wu, Y.P., Yamashita, T., *et al.*** (2004). Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* 306, 1786-1789.

**Zimmer, K.P., Fischer, I., Mothes, T., Weissen-Plenz, G., Schmitz, M., Wieser, H., Buning, J., Lerch, M.M., Ciclitira, P.C., Weber, P., *et al.*** (2010). Endocytotic segregation of gliadin peptide 31-49 in enterocytes. *Gut* 59, 300-310.

## 8.- REFERENCIAS

---





