



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA E INMUNOLOGÍA

LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA DE LAS MUCOSAS

TESIS DOCTORAL:

**Degradación específica del gluten por la
mucosa intestinal de los pacientes
celiacos: posible papel en la patogenia y
en el diagnóstico de la enfermedad.**

Presentada por Sara Vallejo Diez para optar al
grado de Doctora por la Universidad de
Valladolid

Dirigida por:

Eduardo Arranz Sanz

José Antonio Garrote Adrados

Índice

Capítulo I: Introducción

1.1 Introducción a la Enfermedad Celiaca	2
1.1.1 Proteínas de gluten	3
1.1.2 Definición y epidemiología de la Enfermedad Celiaca	7
1.2 Etiopatogenia de la Enfermedad Celiaca	11
1.2.1 Factores genéticos	15
1.2.2 Factores ambientales	17
1.2.2.1 Gluten	17
1.2.2.2 Otros factores	21
1.2.3 La mucosa intestinal como órgano diana	24
1.3. Clínica y diagnóstico de la Enfermedad Celiaca	30
1.3.1 Criterios diagnósticos de la Enfermedad Celiaca	32
1.3.2 Pruebas serológicas	34
1.3.2.1 Marcadores serológicos actuales	35
1.3.2.2 Principales problemas de las pruebas serológicas	39
1.3.3 Marcadores genéticos	40
1.4. Tratamiento y monitorización de la Enfermedad Celiaca	41

Capítulo II: Justificación

2.1 Justificación	47
-------------------------	----

Capítulo III: Objetivos

3.1 Objetivos	53
---------------------	----

Capítulo IV: Sujetos de estudio y muestras

4.1 Pacientes	57
4.2 Muestras	58

Capítulo V: Actividad degradadora de prolaminas específica de la mucosa duodenal de los pacientes celíacos

5.1 Antecedentes	62
5.2 Objetivos concretos	64
5.3 Material y métodos	66
5.4 Resultados	
5.4.1 Las proteasas presentes en los explantes duodenales de los pacientes celíacos con capaces de degradar las prolaminas de una variedad de avena.	71

5.4.2 Detección de actividad degradadora de gliadina específica de los pacientes celíacos en muestras de jugo y cepillado duodenal	75
5.4.3 El péptido 8-mer aparece únicamente en cereales tóxicos para los celíacos y tiene una secuencia que se solapa o está próxima a tres epítomos de gluten ya descritos	83

Capítulo VI: Alteraciones en el epitelio intestinal tras el estímulo con péptidos de gluten y/o muestras de jugo y cepillado duodenal de pacientes celíacos.

6.1 Antecedentes	91
6.2 Objetivos concretos	92
6.3 Material y métodos	93
6.4 Resultados	
6.4.1 El jugo duodenal de los pacientes celíacos altera la estructura de las uniones estrechas en células Caco-2 de forma similar a la gliadina y el gluten	100
6.4.2 Las muestras de jugo duodenal de los pacientes celíacos disminuyen la expresión de TGF- β y aumentan la de MICA en las células Caco-2	102
6.4.3 Las muestras de cepillado duodenal de los pacientes celíacos disminuyen la expresión de la ocludina y la Zo-1 en las células Caco-2	105
6.4.4 Las muestras de cepillado duodenal de los pacientes celíacos favorecen el incremento en la expresión de la IL-15 provocado por los péptidos 8-mer y 33-mer en las células caco-2	106
6.4.5 Las muestras de jugo duodenal de los pacientes celíacos favorecen la disminución en la expresión del TGF- β provocada por el péptido 33-mer en las células caco-2	109
6.4.6 Las muestras de cepillado duodenal de los pacientes control no celíacos contrarrestan el incremento en la expresión de MICA provocado por los péptidos 8-mer y 33-mer en las células caco-2	111

6.4.7 Las muestras de cepillado duodenal de los pacientes control no celíacos y de los pacientes celíacos en dieta sin gluten contrarrestan el incremento de la expresión de la Zo-1 provocado por los péptidos 8-mer y 33-mer respectivamente en las células caco-2	113
--	-----

Capítulo VII: Detección de anticuerpos IgA específicos frente al péptido 8-mer en los pacientes celíacos

7.1 Antecedentes	119
7.2 Objetivos concretos	120
7.3 Material y métodos	121
7.4 Resultados	
7.4.1 La desaminación del péptido 8-mer incrementa su afinidad de unión con los anticuerpos IgA	126
7.4.2 Estandarización de un ensayo ELISA para la detección de anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer	129
7.4.3 Detección de anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer en muestras de plasma de pacientes celíacos adultos	139
7.4.4 Detección de anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer en muestras de plasma de pacientes celíacos infantiles	141
7.4.5 Ausencia de anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer en muestras de plasma de pacientes adultos con Enfermedad Inflamatoria Intestinal	145
7.4.6 Detección de anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer en muestras de jugo duodenal de pacientes celíacos adultos	150

Capítulo VIII: Resumen y discusión final

8.1 Resumen y discusión	157
-------------------------------	-----

Capítulo IX: Conclusiones

9.1 Conclusiones	167
------------------------	-----

Capítulo X: Bibliografía

10.1 Bibliografía	173
-------------------------	-----

Capítulo I

Introducción

1.1 Introducción a la Enfermedad Celiaca

Los cereales constituyen la fuente de nutrientes más importante de la humanidad. Históricamente están asociados al origen de la cultura y civilización de todos los pueblos. Cada zona geográfica del planeta consume un tipo de cereales específicos creando toda una cultura gastronómica en torno a ellos. Entre los europeos domina el consumo de trigo; entre los americanos el de maíz, el arroz es la comida esencial de los pueblos asiáticos y el sorgo y el mijo son propios de las comunidades africanas. Debido a sus características nutritivas, su moderado coste y su capacidad para provocar saciedad inmediata, representan un modo básico de alimentación. Los cereales (del latín Ceres, diosa de la agricultura) son gramíneas, herbáceas cuyos granos o semillas están en la base de la alimentación tanto humana como del ganado. Sus nutrientes se encuentran distribuidos de forma heterogénea en los distintos componentes del grano (germen, endospermo, revestimiento de la semilla y distintas capas que lo recubren). El valor nutricional de los cereales puede verse alterado durante su procesamiento en la elaboración de sus diferentes formas de presentación, como la harina.

El trigo es con diferencia el cereal más consumido por el hombre en la civilización occidental, y no solamente en alimentos como el pan, pasta y galletas, sino que otros productos como sopas, salsas, caramelos, helados, patatas fritas e incluso medicamentos y suplementos vitamínicos contienen trigo.

La harina de trigo está compuesta principalmente por almidón (70-75%), agua (14%), lípidos (2%) y proteínas (10-15%). Las proteínas presentes en la harina de trigo pueden clasificarse en función de su solubilidad y de su funcionalidad. La primera clasificación fue desarrollada por Osborne [1] en 1924 (**Tabla 1**) y consiste en una serie de extracciones consecutivas en agua, solución de sal diluida, solución de alcohol y solución de ácidos o álcalis diluidos. Mediante esta secuencia de separación las proteínas se clasifican en albúminas, globulinas y prolaminas.

Fracción de Osborne	Comportamiento en solubilidad	Composición	Papel biológico	Papel funcional
Albúminas	Extraíbles en agua	Proteínas monoméricas, no pertenecientes al gluten	Proteínas estructurales y metabólicas	Variable
Globulinas	Extraíbles en sales diluidas	Proteínas monoméricas, no pertenecientes al gluten	Proteínas estructurales y metabólicas	Variable
Prolaminas	Extraíbles en soluciones de alcohol o en ácido acético.	Gliadinas monoméricas y polímeros de glutenina de bajo peso molecular, pertenecientes al gluten.	Proteínas de almacenamiento de la semilla	Viscosidad y elasticidad de la masa.

Tabla 1: Clasificación de las proteínas de trigo en función de su solubilidad y funcionalidad, desarrollada por Osborne en 1924 [1].

1.1.1 Proteínas de gluten

Se denomina gluten a la proteína elástica y cohesiva que se obtiene después de haber retirado el almidón del amasado de harina y agua [2]. Es una proteína de bajo valor nutritivo, cuyo uso se masificó debido a su capacidad de retener aire en la matriz proteica facilitando que la masa se adhiera mejor, fenómeno que favorece la elaboración del pan. El gluten se encuentra, junto con el almidón, en la semilla de los cereales más consumidos a nivel mundial como son el trigo, cebada, centeno y algunas variedades de avena. Existe un amplio número de cereales libres de gluten como maíz, mijo, sorgo, amaranto y los cereales andinos quínoa y arroz.

El gluten contiene una gran cantidad de proteínas, tanto libres en forma de monómeros como unidas por puentes disulfuro formando polímeros. En su estado nativo estas proteínas tienen pesos moleculares de entre 30.000 y más de 10 millones. Las proteínas de gluten constituyen más del 50% de las proteínas de almacenamiento de los cereales y pueden separarse, según su solubilidad en etanol 40-70%, en prolaminas (solubles) y gluteninas (insolubles). Mientras que la función principal de las prolaminas es ofrecer viscosidad y extensibilidad a la masa de harina, las gluteninas son las responsables de la elasticidad y cohesividad de la misma, de forma que ambas determinan la calidad del producto final.

Las prolaminas se caracterizan por tener una composición rica en residuos de prolina (P) y glutamina (Q), y reciben diferentes nombres según el cereal que las contenga (**Tabla 2**).

Cereal	Prolamina	Contenido (%)
Trigo	Gliadina	69%
Centeno	Secalina	30-50%
Cebada	Hordeína	46-52%
Avena	Avenina	16%

Tabla 2: Nomenclatura de las prolaminas en función del cereal que las contenga y porcentaje de las mismas sobre las proteínas totales.

Dado que el trigo es el cereal más empleado en el consumo humano y que presenta un elevado contenido en prolaminas, la gliadina ha sido y es la prolamina más estudiada. En muchas ocasiones se habla de gliadina haciendo referencia al conjunto de proteínas solubles en alcohol presentes en los cereales que contienen gluten y, sin embargo, la gliadina se encuentra únicamente en el trigo.

La mayoría de las gliadinas se presentan como monómeros y se clasifican en 4 clases diferentes [2-3] en función de las siguientes características: movilidad electroforética a pH bajo, composición aminoacídica, secuencia aminoacídica y peso molecular (**Tabla 3**).

Tipo	Peso molecular x 10 ⁻³	Proporción de gliadina de acuerdo al contenido proteico total del gluten (%)	Composición parcial de aminoácidos (%)				
			Gln	Pro	Phe	Tyr	Gly
ω5-Gliadinas	49-55	3-6	56	20	9	1	1
ω1,2-Gliadinas	39-44	4-7	44	26	8	1	1
α/β-Gliadinas	28-35	28-33	37	16	4	3	2
γ-Gliadinas	31-35	23-31	35	17	5	1	3

Tabla 3: Clasificación de las gliadinas. Gln: glutamina; Pro: prolina; Phe: fenilalanina; Tyr: tirosina y Gly: glicina.

Las α/β -gliadinas y γ -gliadinas son las más abundantes en el trigo. Las ω -gliadinas se caracterizan por su alto contenido en glutamina, prolina y fenilalanina que juntas suman casi el 80% de las proteínas totales. Las α/β -gliadinas y γ -gliadinas [2] son muy parecidas tanto en peso molecular como en el contenido en prolina y glutamina, la principal diferencia entre ellas reside en los dominios N-terminal y C-terminal.

Las α/β -gliadinas presentan el dodecapéptido QPQPFPQQPYP como unidad repetitiva en el extremo N-terminal [2], mientras que en las γ -gliadinas es QPQQPFP. En cuanto a los dominios en el extremo C-terminal, que son homólogos en ambos tipos de gliadinas, no presentan unidades repetitivas y tienen menos cantidad de residuos de glutamina y prolina que el extremo N-terminal.

Las gluteninas [2] son un conjunto de proteínas unidas por puentes disulfuro y su tamaño varía de 500.000 a más de 10 millones de Dalton (Da), algunas de ellas son las proteínas más grandes presentes en la naturaleza. Las gluteninas se dividen en función de su peso molecular [4] en LMW (*Low Molecular Weight*) y HMW (*High Molecular Weight*) (**Tabla 4**). Las LMW constituyen aproximadamente el 20% de las proteínas de gluten. Son similares a las α/β -gliadinas y las γ -gliadinas en su peso molecular, composición aminoacídica y en el extremo C-terminal. En el extremo N-terminal presentan unidades repetitivas de QQPPFS. Las HMW son las proteínas minoritarias del gluten y se subdividen en dos tipos en función del peso molecular.

Tipo	Peso molecular $\times 10^{-3}$	Proporción de gliadina de acuerdo al contenido proteico total del gluten (%)	Composición parcial de aminoácidos (%)				
			Gln	Pro	Phe	Tyr	Gly
x-HMW-GS	83-88	4-9	37	13	0	6	19
y-HMW-GS	67-74	3-4	36	11	0	5	18
LMW-GS	32-39	19-25	38	13	4	1	3

Tabla 4: Clasificación de las gluteninas. Gln: glutamina; Pro: prolina; Phe: fenilalanina; Tyr: tirosina y Gly: glicina. HMW(*High molecular weight*): alto peso molecular; LMW (*Low molecular weight*): bajo peso molecular.

Durante la digestión, las proteínas contenidas en los alimentos son hidrolizadas por enzimas proteolíticas en el tracto gastrointestinal en pequeños péptidos y aminoácidos que son transportados a través del epitelio [2]. El gran contenido en prolina y glutamina de las proteínas del gluten de trigo, cebada, centeno y avena las hace

resistentes a la completa digestión proteolítica en el intestino humano. Como consecuencia se produce un acumulo de péptidos de diferente tamaño en el intestino delgado que pueden generar un efecto tóxico en pacientes genéticamente predispuestos y dar lugar a una intolerancia permanente a las proteínas del gluten presentes en trigo, cebada y centeno, denominada Enfermedad Celiaca (EC) [5].

La avena, sin embargo, es un cereal cuya toxicidad para estos pacientes no está del todo definida, y su inclusión en la dieta sin gluten (DSG) que deben seguir los pacientes celiacos ha sido ampliamente debatida. A nivel nutricional, las avenas son una importante fuente de proteínas, grasas, vitaminas, minerales y fibras y por lo tanto podrían ser muy beneficiosas para los pacientes celiacos, mejorando considerablemente su dieta gracias a su agradable sabor y su disponibilidad en el mercado [6]. La avena es un cereal rico en hidratos de carbono de absorción lenta en el organismo que provoca sensación de saciedad, siendo muy útil en el tratamiento de la obesidad. Esta absorción lenta permite también un mayor control de los niveles de azúcar y, por tanto, puede ser consumido sin problema por las personas diabéticas. Además, la avena posee un elevado contenido en fibras insolubles, que favorecen el tránsito intestinal, y fibras solubles que junto con el contenido en ácidos grasos omega-6, ayudan a reducir el colesterol al dificultar su absorción intestinal. Es un cereal rico en vitaminas del grupo B y minerales como hierro, calcio (contiene mayor cantidad que el trigo), zinc, sílice, yodo y fósforo, además de contener aminoácidos como la leucina, isoleucina y treonina, muy importantes en el crecimiento infantil.

En las avenas, aproximadamente el 10-15% de sus proteínas son prolaminas, frente al 40-60% presente en trigo, cebada y centeno. Además, el porcentaje de prolina y glutamina (aminoácidos muy abundantes en las regiones tóxicas) en la avena es inferior que en otros cereales tóxicos [7].

Algunos investigadores clínicos consideran que los pacientes con EC toleran las avenas sin presentar ningún tipo de inflamación intestinal [8-9], siempre que se trate de avenas purificadas y no haya riesgo de contaminación cruzada con otros cereales tóxicos [10]. Por el contrario, existen estudios que confirman la toxicidad de las avenas en ciertos tipos de pacientes celiacos [11-12], como el trabajo realizado por Arentz-Hansen y sus colaboradores quienes detectaron atrofia vellositaria e inflamación de la

mucosa intestinal en pacientes celíacos en DSG tras el consumo de avenas [13]. En un estudio publicado recientemente, Isabel Comino et al [6] estudiaron la inmunogenicidad de diferentes cultivares de avena en los pacientes celíacos. Concluyeron que la inmunogenicidad de las avenas en los pacientes celíacos varía en función del cultivar de avena, de manera que solamente algunos cultivares desencadenan una respuesta inmunológica en estos pacientes. Estos resultados han sido debatidos recientemente en un trabajo publicado por Londono *et al* [14], quienes mediante estudios genéticos de las aveninas presentes en 13 especies de avena, y el empleo de los anticuerpos R5 y G12, no detectaron en dichas avenas ninguno de los epítomos de gluten presentes en el trigo, cebada y centeno.

Debido a la existencia de más de 10 especies diferentes de avena, su reconocido valor nutricional, sus efectos beneficiosos para la salud y su cada vez más frecuente consumo, el interés en el estudio de las avenas ha aumentado considerablemente en los últimos años. Hasta la fecha, se sigue recomendando prudencia a la hora de introducir las avenas en la dieta de los pacientes celíacos, aunque se considera necesario realizar estudios clínicos de introducción de alguna de las variedades de avena identificadas como no tóxicas en pacientes que sigan una DSG bien establecida. Es fundamental confirmar la existencia de una posible respuesta inmune de estos pacientes frente a las diferentes especies de avena, haciendo un seguimiento exhaustivo de pacientes en DSG a los que se les introduce una cantidad controlada de avena.

1.1.2 Definición y epidemiología de la Enfermedad Celíaca

La Enfermedad Celíaca es una intolerancia permanente a las proteínas de gluten de trigo, cebada y centeno en individuos genéticamente predispuestos [15]. La ingesta de gluten provoca una reacción de inflamación en la parte superior del intestino delgado que lleva a un daño tisular y atrofia vellositaria [5]. La lesión e inflamación desaparecen tras varias semanas o meses en dieta sin gluten.

Las primeras descripciones sobre la EC fueron realizadas en la segunda mitad del siglo I dC por Areteo de Capadocia el cual hacía referencia a sujetos desnutridos,

con deposiciones abundantes y malolientes, que empeoraban cuando ingerían trigo. La palabra griega que empleó Areteo para identificar a los pacientes fue *koiliakós* (de la cual deriva la palabra celíaco), que originariamente significa “los que sufren del intestino”. En 1888 Samuel Gee, del Hospital St. Bartholomew de Londres, afirmó que la regulación de la alimentación es la parte más importante del tratamiento y aconsejó la reducción en la ingesta de harinas para controlar los efectos [16]. La causa de la EC permaneció desconocida durante más de 50 años hasta que alrededor de 1940 el pediatra holandés WK Dicke definió el agente etiológico de la patología [17-20].

Se postula que existe una relación entre la historia de migración poblacional y el tiempo de exposición al gluten, ya que la migración europea se caracterizó por una importante sustitución de las poblaciones locales mesolíticas por poblaciones neolíticas provenientes del sudoeste de Asia (donde seguramente se inició el cultivo de una gran variedad de cereales silvestres). Los marcadores genéticos confirman los patrones de migración de los ancestros, que revelan que la migración de los agricultores fue acompañada del haplotipo HLA-B8. La prevalencia de este marcador es inversamente proporcional a la duración que tiene el cultivo de trigo, existiendo menor frecuencia de HLA-B8 en las poblaciones que han convivido con el trigo por más tiempo [21].

Hasta hace unos 20 años, la EC era considerada una enfermedad poco frecuente que afectaba, fundamentalmente, a niños de origen caucasiano, y que se manifestaba con un cuadro de malabsorción intestinal. En la actualidad la EC es un proceso frecuente (1-3% en la población Europea), de distribución mundial, que afecta tanto a niños como a adultos y que puede manifestarse con formas clínicas sintomáticas (clásica y atípica) o asintomáticas (silente, latente y potencial) [22]. En 1996, Catassi publicó el primer artículo que demostró la verdadera dimensión de la EC en la población general [23]. La EC es frecuente no sólo en los países desarrollados sino que su presencia está aumentando en zonas del mundo en desarrollo, como el norte de África e India. Hasta hace relativamente poco tiempo se pensaba que la enfermedad celíaca no existía en China ni en Centroamérica. El cultivo de arroz y del maíz respectivamente, ha sido el fundamento de la alimentación en estas sociedades. Los cambios ambientales, sociales y culturales en estas regiones permiten prever un aumento de casos de la EC [24]. A pesar de la falta de datos, es posible que la prevalencia de la EC en China y Japón sea baja debido a que ambas naciones tienen, mayoritariamente, una dieta basada en el consumo de arroz. Sin embargo, poco a poco esta dieta está siendo reemplazada por una dieta de

tipo occidental con alimentos con alto contenido de trigo [25] y por lo tanto la EC podría llegar a convertirse en un problema de salud en China. La EC puede contribuir sustancialmente a la morbilidad y mortalidad infantil en muchos países en desarrollo. La población Saharaui, de los campamentos situados en Argelia, tiene la prevalencia más alta de EC conocida hasta el momento (5.6%), lo cual puede explicarse por los altos niveles de consanguinidad, la elevada frecuencia de los alelos HLA-DQ2 y a la fuerte ingesta de gluten de dicha población [26].

Los métodos para cuantificar el número de casos de EC han cambiado a través de los años a medida que se han ido mejorando los métodos de diagnóstico. El conocimiento de la distribución geográfica de la EC puede ayudar a entender los factores genéticos y ambientales fundamentales de la enfermedad. La epidemiología de la EC está muy bien representada por el modelo de iceberg (**Figura 1**), que conserva la validez en diferentes poblaciones del mundo [27]. El iceberg representa las distintas formas de presentación de la sensibilidad al gluten.

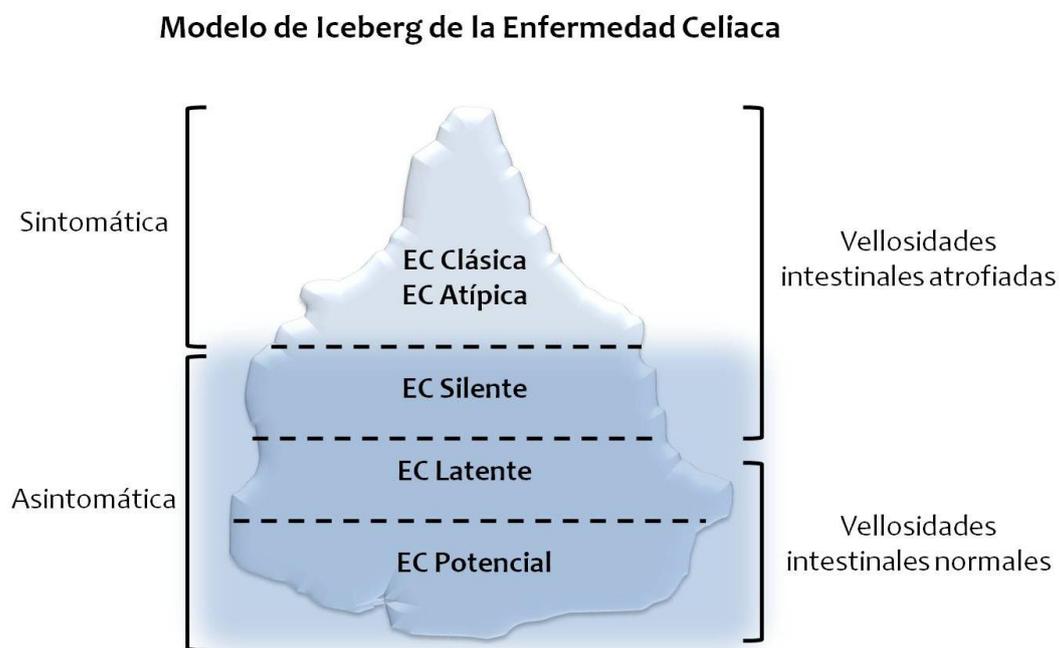


Figura 1: Epidemiología de la Enfermedad Celiaca: modelo de Iceberg.

La prevalencia de la EC (tamaño del iceberg) depende fundamentalmente de la frecuencia del HLA-DQ2/DQ8 en la población mientras que la proporción de pacientes diagnosticados (parte emergida del iceberg) depende del conocimiento de la enfermedad por parte de los profesionales sanitarios, así como de la accesibilidad a las pruebas diagnósticas (serología y biopsia duodenal) y de la intensidad de las manifestaciones clínicas (relacionado principalmente con la edad de introducción del gluten y la cantidad de cereales ingeridos). Siguiendo este modelo, la mayor parte de la población con susceptibilidad genética se encuentra en la parte sumergida del iceberg, y presentan lo que se ha clasificado como enfermedad celiaca silente (asintomática pero con atrofia vellositaria), latente y potencial (asintomática y sin atrofia vellositaria). De esta manera se calcula que por cada paciente diagnosticado de EC, hay entre 5 y 7 casos sin diagnosticar. Hace años, en los primeros estudios epidemiológicos se establecía una prevalencia de la enfermedad muy baja, en torno a un 0,022% de la población [28], que incluía a niños con una forma de presentación clásica. La prevalencia real de la enfermedad celiaca, que es de 1 de cada 100-400 personas (0,25-1%), ha sido establecida mediante la búsqueda activa de casos utilizando test serológicos.

En un estudio promovido por la Unión Europea se demostró que existen variaciones importantes en la frecuencia de la EC entre varios países, de manera que en Finlandia e Irlanda la prevalencia aproximada es de 1:70, mientras que en Alemania es de 1:500 [29]. La explicación a estas diferencias es la existencia de factores ambientales condicionantes de la EC como por ejemplo infecciones gastrointestinales, el momento de inicio del consumo de gluten o la cantidad ingerida del mismo, que varían en el lugar y en el tiempo.

El elevado índice de enfermedades autoinmunes y de alergias en los países industrializados ha sido registrado recientemente, y teniendo en cuenta la hipótesis de higiene, aquellos lugares con un entorno ambiental limpio son los que presentan las frecuencias más bajas de infecciones infantiles y menores diferencias en la composición de la flora bacteriana [30]. La cantidad y calidad del gluten ingerido, la duración de la fermentación de la masa de trigo, el espectro de microorganismos intestinales y su variación a lo largo del tiempo, las infecciones intestinales y las condiciones de estrés podrían funcionar como interruptores en los cambios en el balance entre la respuesta inmune y la tolerancia oral (ausencia de respuesta inmune).

En España, la EC es la enfermedad crónica intestinal más frecuente. Se han publicado cuatro estudios epidemiológicos poblacionales que han mostrado una prevalencia de la EC de 1:220 en niños de entre 10 y 12 años de edad de Madrid [31], de 1:389 en la población en general de Asturias [32], de 1:118 en niños de 3 años del País Vasco [33] y de 1:370 entre los donantes de sangre de Madrid [34]. Se calcula que la prevalencia aproximada de la EC en España está en torno al 0,45-0,85% en la población pediátrica y 0,26% en la población adulta. Es más frecuente en mujeres que en hombres, con una relación 2:1. En la edad pediátrica, el pico con mayor número de casos diagnosticados se da entre niños de 1 y 3 años, mientras que en adultos ocurre en individuos de entre 30 y 50 años. Existe una gran variedad de formas de presentación de la enfermedad. Concretamente en la edad adulta, cada vez son más frecuentes las manifestaciones con un cuadro clínico atípico y, en muchas ocasiones, muy similar a otras patologías, asociadas o no, a la enfermedad celiaca.

1.2 Etiopatogenia de la Enfermedad Celiaca

Después de décadas de investigación, aun no se ha conseguido esclarecer completamente los mecanismos responsables de la enfermedad celiaca. Sabemos que para que se desencadene la EC es necesario la presencia del gluten procedente de la dieta y de las moléculas HLA (*Human Leukocyte Antigen*) clase II expuestas en las células presentadoras de antígeno capaces de presentar los péptidos inmunogénicos derivados del gluten a las células T. En condiciones normales, la respuesta frente a las proteínas de la dieta es de tolerancia oral [35], que se define como la falta de respuesta inmune sistémica frente a determinados antígenos ingeridos, tras su administración posterior por vía sistémica [36]. En la EC hay una pérdida de tolerancia oral frente al gluten [37].

La teoría predominante sobre la patogenia de la EC sostiene la presencia de una respuesta inmunitaria anormal frente al gluten, explicada mediante un modelo de doble señal [38] (**Figura 2**). La primera señal consiste en una respuesta innata crucial desencadenada cuando los péptidos tóxicos derivados de la gliadina entran en contacto directo con el epitelio intestinal. Este efecto tóxico inmediato provoca un estrés sobre las células epiteliales, que liberan grandes cantidades de interleuquina 15 (IL-15), que a

su vez induce la expresión del receptor NKG2D [39] por parte de los linfocitos T y células NK (*Natural Killer*). La IL-15, una glicoproteína producida principalmente por macrófagos, pero también células no linfoides como los enterocitos, tiene una función clave en el mantenimiento de la homeostasis entre la inmunidad innata y la adaptativa [40]. Su expresión está estrictamente regulada a nivel transcripcional, translacional y de tráfico intracelular y cualquier alteración en alguno de estos niveles puede provocar una sobre-expresión de la IL-15, la cual está asociada a una gran cantidad de desordenes intestinales como la Enfermedad Inflamatoria Intestinal y la Enfermedad Celiaca.

Otra consecuencia de este estrés es la expresión en las células epiteliales de uno de los ligandos del receptor NKG2D [41], la proteína MICA (*MHC class I polypeptide-related sequence A*), estructuralmente similar al Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo I (MHCI) y que es expresada también en células endoteliales y fibroblastos bajo una condición de estrés como puede ser un choque térmico o una infección viral [42].

La unión de MICA y NKG2D activa fenómenos de citotoxicidad en el epitelio, induciendo la apoptosis de los enterocitos, que junto con el debilitamiento de las uniones estrechas lleva al aumento de la permeabilidad intestinal que facilita la entrada, a través del transporte transcelular, de péptidos inmunodominantes derivados de la gliadina [43], como el 33-mer, a la lámina propia (fina capa de tejido conectivo situada debajo del epitelio intestinal, formando en conjunto la mucosa intestinal). De esta forma se desencadena la segunda señal, una respuesta inmune adaptativa mediada por los linfocitos T que requieren una presentación antigénica. En la lamina propia los péptidos son desaminados por la transglutaminasa tisular (TGt), aumentando así su afinidad por la molécula HLA-DQ2/DQ8 [44-48] expresada por las células presentadoras de antígeno (CPA). En la lámina propia, las CPA principales son las células dendríticas (CDs) las cuales son activadas por la IL-15 derivada de la respuesta innata. Las CDs presentan el antígeno a los linfocitos T CD4⁺ de la lámina propia, responsables de una respuesta dominada por citocinas con un perfil Th1, con predominio de interferón gamma (IFN γ) y otras citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF α) y varias interleuquinas como IL-1 β , IL-12, IL-15, IL18 y IL-27 [49-50], descendiendo la secreción de citocinas reguladoras como el factor de crecimiento tumoral (TGF- β) y anti-inflamatorias. El TGF- β es una citocina multifactorial que juega un papel importante en la regulación de las condiciones autoinmunes y de las respuestas

inflamatorias intestinales [51], además establecer la tolerancia oral [52].

Las células T específicas de gluten, en el contexto de un perfil Th2 de citocinas (IL-4, IL-6 e IL-10 entre otras) activan la clonación 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 TGt.

El ambiente de estrés alcanzado en la lámina propia, aumenta los niveles de expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular y de síntesis de quimioquinas que, en conjunto, atraen más células inflamatorias al tejido. El aumento en la secreción de las citocinas proinflamatorias Th1 promueven la secreción de metaloproteasas de la matriz (MMPs) por parte de los fibroblastos. Las MMPs [53] son una familia de proteínas dependientes de zinc capaces de degradar los componentes de la matriz extracelular como proteoglicanos y glicoproteínas, participando en el remodelado del tejido. La actividad proteolítica de las MMPs está controlada por unos inhibidores específicos [54] denominados TIMPs (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*), los cuales se unen al dominio catalítico de las enzimas, bloqueando su actividad. En la EC, los niveles de expresión de MMP-1, MMP-3, MMP-9 y TIMP-1 están incrementados de una manera directamente proporcional al grado del daño tisular del paciente [55], por lo que se baraja la posibilidad de que durante la fase activa de la EC exista un patrón de MMPs característico.

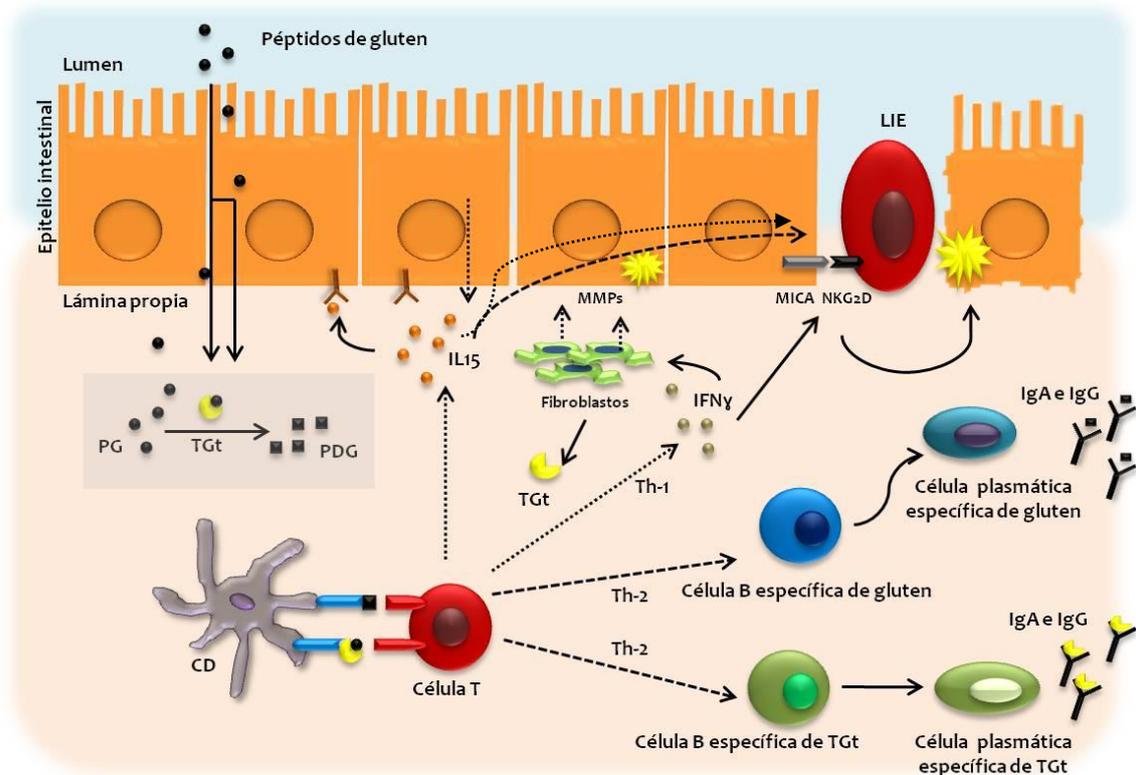


Figura 2: Efecto doble del gluten en la mucosa intestinal de los pacientes celíacos. En el tracto duodenal de los pacientes celíacos, las proteínas son hidrolizadas por las enzimas digestivas en pequeños péptidos de gluten (PG) los cuales tiene un efecto doble sobre la mucosa intestinal. Los PG tienen un efecto tóxico tras el contacto directo con el epitelio desencadenando una respuesta inmune innata debido al estrés que provocan en los enterocitos, los cuales liberan una gran cantidad de IL-15 que induce la expresión del receptor NKG2D en los linfocitos intraepiteliales (LIEs) y la de su ligando MICA en los enterocitos. La formación de este complejo activa mecanismos de apoptosis en los enterocitos, aumentando la permeabilidad intestinal y el paso de péptidos a la lámina propia. Una vez allí, los PG son desaminados (PDG) por la enzima transglutaminasa tisular (TGt). La desaminación aumenta la afinidad de los péptidos con las moléculas HLA de las células dendríticas (CDs), que presentan el antígeno (PDG o complejos TGt-PG) a las células T. Éstas, mediante la secreción de citocinas proinflamatorias con un perfil Th-1 dominado por el IFN γ promueven la secreción de metaloproteasas de la matriz celular (MMPs) por parte de los fibroblastos, degradando la matriz extracelular e incrementando la toxicidad de los enterocitos y LIEs. Además, en el contexto de un perfil de citocinas Th-2, las células T conducen a la activación y clonación de células B que se diferencian en células plasmáticas y producen anticuerpos frente a los PDG y la TGt.

1.2.1 Factores genéticos

En el desarrollo de la EC intervienen diversos factores. El hecho de que el gluten no resulte nocivo para la gran parte de la población significa que debe haber una susceptibilidad individual al desarrollo de la enfermedad, la cual está sustentada en factores genéticos. Los familiares de primer grado de un paciente celiaco presentan un riesgo de desarrollar la enfermedad 20 veces mayor que el resto de la población. La susceptibilidad genética puede ser resultado de una predisposición colectiva de varios genes polimórficos en varias regiones del genoma humano.

La asociación de la EC con la región HLA es una de las más fuertes descritas en cualquier patología [56]. La implicación de la región HLA de clase II es incuestionable [57]. En la mayoría de las poblaciones estudiadas más del 90% de los pacientes celiacos expresan el heterodímero HLA-DQ2 codificado por los alelos DQA1*05 y DQB1*02 [58], mientras que algunos pacientes DQ2-/DQ8- portan alelos que codifican para solamente una cadena del heterodímero DQ2 (DQA1*05 o DQB1*02) [59]. Este heterodímero tiene un papel dominante en la susceptibilidad de la EC por su implicación patogénica: los péptidos de gliadina, tras ser desaminados por la enzima TGt, presentan una mayor afinidad por la hendidura específica de los heterodímeros DQ2 expresados en la membrana de las CPA. De esta manera son reconocidos de una forma eficaz por los linfocitos T reactivos frente al gluten en el intestino de los pacientes celiacos [39-40]. El heterodímero HLA-DQ8 juega un papel muy similar al del DQ2 pero en este caso no está clara la necesidad de desaminación previa de los péptidos por parte de la TGt. Aproximadamente el 25% de la población general y el 95 % de los pacientes celiacos, es HLA-DQ2 positiva [56]. El papel de las moléculas HLA-DQ2/DQ8 como factores genéticos responsables de orquestar la respuesta inmune frente a los péptidos de gluten en la EC ha sido demostrado [5, 60], y por lo tanto son una condición necesaria para desarrollar la enfermedad celiaca, pero no suficiente.

En la EC, la unión entre el factor ambiental protagonista, el gluten, y el principal factor de susceptibilidad, la molécula HLA-DQ2 fue revelada en 1993 [61] gracias al hallazgo de células T CD4⁺ específicas del gluten unido al complejo HLA-DQ2. Las bases moleculares de la interacción entre los péptidos derivados del gluten y las moléculas HLA-DQ2/DQ8 es bien conocido y depende las propiedades fisicoquímicas

de ambas partes, que son capaces de reconocer una gran cantidad de epítomos de gluten [62].

La presencia de las moléculas HLA-DQ2/DQ8 (6p21) supone únicamente alrededor de un 53% del riesgo de sufrir la enfermedad celiaca [63]. La tasa de concordancia de EC entre gemelos monozigóticos es mayor del 80% y del 20% entre dizigóticos [64], por lo tanto regiones diferentes a la HLA deben estar implicadas en la EC. Un gran avance en la búsqueda de posibles genes no-HLA implicados en la enfermedad han sido los estudios de asociación del genoma completo o GWAS (*Genome-Wide Association Studies*) [65], los cuales han identificado 26 loci que no pertenecen a la región HLA y han sugerido otros 13 loci como genes de susceptibilidad de la EC [66]. Los 39 loci no-HLA incluyen 115 genes diferentes [67]. Al menos 28 de las 39 regiones contienen genes que intervienen en vías de señalización implicadas en la EC como la inmunidad adaptativa, inmunidad innata, señalización celular, maduración y diferenciación de los linfocitos T o la vía de señalización del NF- κ B entre otros [66].

Aunque estos genes no-HLA solo representen el 5% del riesgo genético de desarrollar la enfermedad, además de estar implicados en muchas otras enfermedades relacionadas con el sistema inmune, refuerzan la evidencia de que existen diversos factores exógenos que determinan en qué situaciones un individuo desarrolla la EC y no otra patología relacionada (**Figura 3**). La susceptibilidad genética es necesaria para el desarrollo de la EC, pero no suficiente.

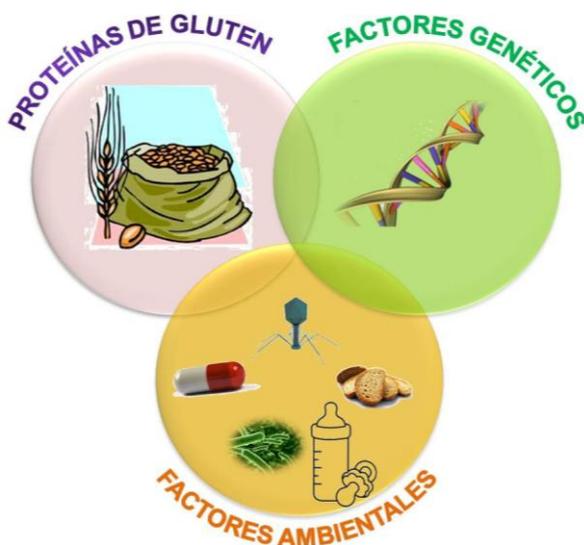


Figura 3: Factores determinantes de la Enfermedad Celiaca: proteínas de gluten (factor desencadenante), factores genéticos (moléculas HLA-DQ2/DQ8 y otros genes no-HLA) y factores ambientales (infecciones virales, tratamientos, alteraciones de la flora bacteriana, momento de inserción del gluten en la dieta y cantidad de gluten ingerida).

1.2.2 Factores ambientales

2.2.1 El gluten

El proceso central que define la EC es una intolerancia permanente a los péptidos de gluten, lo que convierte a este conjunto de proteínas en el factor ambiental clave en el desarrollo de la enfermedad. Prueba de ello es que en la mayoría de los casos, el cumplimiento estricto de la dieta sin gluten conduce, en pocos meses, a la recuperación rápida y completa de la arquitectura y función de la mucosa del intestino delgado, así como a la remisión de los síntomas y la normalización de las pruebas serológicas [68].

La absorción normal de proteínas de la dieta en el intestino humano puede explicarse en tres etapas principales: en primer lugar las proteínas son degradadas mediante la proteólisis que se inicia en el estómago mediante enzimas como la pepsina y continúa más adelante en el duodeno con las proteasas pancreáticas y carboxipeptidasas. El resultado son oligopéptidos que se procesan más adelante por peptidasas ancladas al borde en cepillo del epitelio intestinal y finalmente los aminoácidos y péptidos resultantes son transportados a través del epitelio hasta la lámina propia de donde viajan a todo el cuerpo por el torrente sanguíneo.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el alto contenido en prolina y glutamina de las proteínas del gluten, las hace resistentes a una completa digestión proteolítica en el intestino humano [69]. Ya en el año 1955, poco después de que el gluten fuera identificado como desencadenante de la EC, Frazer *et al* [70] demostraron que la digestión de la gliadina por la pepsina gástrica y la tripsina pancreática generaba péptidos de pesos moleculares inferiores a 15000 Da que resultaban tóxicos para los pacientes celíacos.

Existen unas enzimas llamadas proliloligopeptidasas o prolilendopeptidasas (POPs o PEPs), capaces de hidrolizar los enlaces peptídicos internos en los que participan residuos de prolina. Estas enzimas han sido identificadas y aisladas en arqueas, bacterias y eucariotas [71], sin embargo, no forman parte del elenco de enzimas gástricas, pancreáticas y del cepillo intestinal que intervienen en la digestión de los

alimentos. Como consecuencia, se generan una serie de péptidos de diferentes tamaños que se acumulan en el duodeno y que, en individuos genéticamente predispuestos, pueden tener un efecto tóxico contribuyendo al desarrollo de la EC. De todas las prolaminas que se conocen, la gliadina ha sido la más estudiada hasta el momento.

Los péptidos derivados de la degradación de la gliadina están involucrados en el desarrollo de la enfermedad, bien por su efecto tóxico directo o inmunogénico [72]. Se considera que un fragmento tiene efecto tóxico (**Tabla 5**) cuando es capaz de producir un daño en la mucosa intestinal o bien en condiciones *in vitro*, al agregarlo en el medio de cultivo de una biopsia intestinal, o *in vivo* al ser administrado en la región proximal o distal del intestino [73].

Secuencia aminoacídica	Posición	Toxicidad
VPVPQLQPQNPSQQQPQEQ	α 3-21	-
PGQQQPFPPQQPY	α 31-43	+
PGQQQPFPPQQPYQPQPQF	α 31-49	+
PGQQQPFPPQQPYQPQPQFPSQQPY	α 31-55	+
PQPQFPSQQPY	α 44-55	+
SQQPYLQLQPFQPQLPY	α 51-70	+
LQLQPFQPQLPYQPQLPY	α 56-75	+
QQPYLGPGSFRPSQQNPQA	α 202-220	-
LGQGSFRPSQQN	α 206-217	+

Tabla 5: Listado de péptidos derivados de la gliadina y su toxicidad [73]. De cada uno de los péptidos se muestra la secuencia, la posición en la α -gliadina y su toxicidad (+ péptido tóxico y – péptido no tóxico).

En cambio, un péptido se considera inmunogénico (**Tabla 6**) cuando es capaz de estimular de forma específica a los linfocitos T CD4⁺ específicos del complejo HLA-DQ2/DQ8, derivados tanto de la mucosa intestinal como de sangre periférica.

Algunos de los péptidos inmunogénicos son además epítomos inmunodominantes, ya que son capaces de inducir *in vitro* una respuesta de las células T en casi todos los pacientes, mientras que aquellos epítomos inmunogénicos tienen este mismo efecto solamente en algunos casos. Además, si un paciente celiaco en una dieta sin gluten comete una transgresión, se detectan en sangre de una forma mucho más rápida las células T específicas de epítomos inmunodominantes que aquellas que reconocen epítomos inmunogénicos [74].

Secuencia aminoacídica	Posición	Inmunogenicidad
VRVPVQLQPQNPSQQQPQ	α -gliadina: 1-19	+
QNPSQQQPQEQVPLVQQQ	α -gliadina: 11-28	+
QVPLVQQQQFPGQQQPFPPQ	α -gliadina: 21-40	+
PGQQQPFPPQQYPQPQPF	α -gliadina: 31-49	+
FPGQQQPFPPQQYPQPQPF	α -gliadina: 30-49	+
QYPQPQPFPSQQPYLQL	α -gliadina: 41-58	+
PQPFPSQQPYLQLQPFQ	α -gliadina: 46-63	+
PQPQLPYPQPQLPY	α -gliadina: 62-75/(a)	+ /+++
QLQPFQPQLPY	α -gliadina: 57-68/(a)	+ /+++
QLQPFQ	α -gliadina: 57-63(a)	+++
LQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF	α -gliadina: 57-89/(a)	+ /+++
QLQPFQPQLPY	α -gliadina: 58-69(a)	+ /+++
PQPQLPYPQPQLPY	α -gliadina: 63-76/(a)	+ /+++
PFRPQQYPQPQPQ	α -gliadina: 93-106/(a)	+
LIFCMDVVLQ	α -gliadina: 123-132	+
QQPLQQYPLGQGSFRPSQQNPQAQG	α -gliadina: 198-222	+
QYPLGQGSFRPSQQNPQA	α -gliadina: 203/220/(a)	+ /+
PSGQGSFQPS	α -gliadina: 205-214	-
PSGQGSFQPSQQ	α -gliadina: 205-216/(a)	+ /+++
SGQGSFQPSQQN	α -gliadina: 206-217/(a)	+ /+++
QGSFQPSQQN	α -gliadina: 208-217/(a)	- /+++
LQPQQPFPPQQPYPQPQPQ	γ -gliadina: 60-79	+
FPQQPQQPYPQPQPQ	γ -gliadina: 66-78	+
FSQPQQQFPQPQ	γ -gliadina: 102-113/(a)	- /+
OQPQQSFPEQQ	γ -gliadina: 134-153/(a)	+ /+++
VQGQGHQPQQAQL	γ -gliadina: 222-236/(a)	+ /+
QQQPPFSQQQSFPSQQQ	glutenina: 40-59/(a)	- /+
QPPFSQQQQLPQ	glutenina: 46-60/(a)	- /+
SGQGQRPGQWLQPGQGQQGYPTSPQQSGQGQQLGQ	glutenina: 707-742/(a)	+ /+
PGQGQQGYPTSPQQSGQ	glutenina: 719-736	+
GYPTSPQQSGQGQQLGQ	glutenina: 725-742	+
GYPTSPQQSG	glutenina: 725-735	+
QGYPTSPQQS	glutenina: 724-734/(a)	+ /-
QQGYPTSPQQSG	glutenina: 723-735	+
GQQGYPTSPQQSG	glutenina: 722-735	+
GQQGYPTSPQQS	glutenina: 722-734	+

Tabla 6: Listado de péptidos derivados de la digestión de la gliadina y su inmunogenicidad [73]. Algunos de los péptidos identificados como inmunogénicos, además son inmunodominantes (marcados con +++), los cuales son capaces de inducir una fuerte respuesta en las células T. Los péptidos desaminados están señalados con la letra (a).

Existen péptidos que en su estado nativo no ejercen ningún efecto pero que tras ser desaminados por la enzima transglutaminasa tisular se convierten en unos potentes estimuladores de las células T.

La transglutaminasa tisular (TGt) o transglutaminasa 2 es una enzima de 686 aminoácidos con diversas funciones, todas ellas dependientes de calcio. Su distribución

celular no se restringe a un compartimento específico y puede ser detectada en la matriz extracelular o intracelularmente. La principal actividad de la TGt, en situaciones de $\text{pH} > 7$ es catalizar la unión covalente e irreversible de una proteína con un residuo de glutamina a un residuo de lisina de otra proteína. Además, cataliza reacciones de transaminación mediante la incorporación de grupos amino (poliaminas o histamina) en las proteínas. En ausencia de grupos amino disponibles o en condiciones de $\text{pH} < 7$, la TGt cataliza reacciones de deamidación, transformando la glutamina unida a proteínas en ácido glutámico [75]. La gliadina es uno de los sustratos preferidos de esta enzima ya que alrededor del 36% de sus residuos de glutamina son susceptibles de modificación tanto por la incorporación de poliaminas como por la liberación de NH_3 mediante la desaminación.

El péptido 33-mer (LQLQPFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF), procedente de la α -gliadina y compuesto por 33 aminoácidos (residuos 57-89), es el péptido inmunogénico e inmunodominante de mayor tamaño identificado hasta el momento. Este péptido, resistente a las proteasas, ha sido descrito como el péptido de gluten reconocido por las células T específicas de gluten con más actividad [76-77].

Cada vez se conoce más acerca de los péptidos generados durante la degradación del gluten, sin embargo, el origen de la actividad enzimática responsable de esa degradación sigue siendo a día de hoy un gran desconocido. Tradicionalmente, se consideraba que la EC era consecuencia de una deficiencia enzimática en el borde en cepillo intestinal, lo que provocaba una degradación incompleta del gluten y su consecuente efecto tóxico. Se confirmaron deficiencias en algunas enzimas como dipeptidasas [78], pero tras la DSG se recuperaban los niveles normales. Actualmente se sabe que la digestión del gluten es incompleta tanto en pacientes celíacos como en individuos sanos, y que la EC es debida a una respuesta incorrecta frente al péptido tóxico y no únicamente a la presencia del mismo. Sin embargo, una de las dianas terapéuticas propuestas para la EC es precisamente la degradación del gluten, utilizando las PEPs mediante administración oral [79], las cuales podrían complementar la acción de las proteasas pancreáticas debido a su capacidad de acelerar la digestión del gluten en el tracto intestinal.

1.2.2.2 Otros factores ambientales

Además de la susceptibilidad genética y de la ingesta de gluten, existen factores ambientales que pueden favorecer el desarrollo de la enfermedad celiaca (**Figura 3**).

Hace años, cuando la provocación con gluten era una prueba utilizada para el diagnóstico de la EC, surgió la duda de un efecto-dosis en el desarrollo de la enfermedad. El momento de introducción del gluten en los niños es un factor que se considera determinante en individuos genéticamente predispuestos y tanto su introducción temprana (antes de los 3 meses de edad), como tardía (después de los 7 meses de edad), se asocia con un riesgo incrementado de EC y con el desarrollo de autoinmunidad relacionada con esta enfermedad [80]. La cantidad de gluten ingerida, principalmente en el primer año de vida podría también tener un valor determinante en individuos con susceptibilidad genética [81-82]. Otros factores contribuyentes incluyen las infecciones asociadas a variaciones estacionales [83] y la duración de la lactancia materna. Por otro lado, el consumo de medicamentos puede incrementar la susceptibilidad al gluten en individuos genéticamente predispuestos [84].

Las infecciones intestinales pueden causar un incremento temporal de la permeabilidad intestinal lo que podría provocar un aumento en la liberación de la enzima transglutaminasa tisular que, a su vez, incrementa la inmunogenicidad de los péptidos de gluten [85]. Las infecciones virales, en particular las de enterovirus como los rotavirus [86], han sido consideradas como factores de incremento de la incidencia de la enfermedad celiaca y otras enfermedades autoinmunes como la diabetes tipo 1 [87]. Stene *et al* [88] encontraron mayor riesgo de sufrir la EC en niños con infecciones repetidas de rotavirus, lo cual podría tener su explicación en la homología entre la proteína VP-7 de los rotavirus y la enzima TGt [89]. Además, estudios realizados en ratones tratados con ácido poliinosinico-policitidilico (poly I:C) como modelo de infección con virus de ARN de doble cadena indicaron que las infecciones virales pueden promover la activación de la enzima TGt [90]. Por otro lado, las infecciones virales inducen la producción de IFN tipo I [91] el cual tiene propiedades inmunoestimuladoras.

Las células epiteliales secretan péptidos antimicrobianos, como las defensinas [92], con el objeto principal de evitar la entrada de bacterias comensales y patógenas a

la lámina propia. La microbiota comensal que está en contacto con el epitelio intestinal tiene una importante función en el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune en el intestino. Una alteración en el balance entre tolerancia e inmunidad probablemente contribuya a la patogénesis de la mayoría de condiciones inflamatorias incluyendo las intolerancias alimentarias.

Las bacterias comensales son adquiridas inmediatamente después del nacimiento y llegan a alcanzar una densidad de 10^{12} células/ml en el lumen del intestino delgado de un humano adulto. Los beneficios que ofrece la flora comensal en la fisiología del hospedador requieren una baja respuesta del mismo frente a las comunidades bacterianas. Para un desarrollo y funcionamiento normal de la mucosa intestinal es necesario un nivel de reconocimiento inmune innato de las bacterias comensales [93]. Se han realizado estudios con ratones gnotobióticos (con una flora bacteriana conocida, libres de gérmenes patógenos) en los que se ha observado un defecto en la formación de las placas de Peyer, y una alteración en la formación de linfocitos en comparación con ratones en condiciones normales [94]. Existe un modelo que sostiene que los componentes del sistema inmune innato están comprobando continuamente la dinámica composición de la flora comensal. Tanto los enterocitos como las células dendríticas expresan gran cantidad de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) [95] que reconocen estructuras únicas presentes en la superficie de los microorganismos que están en contacto directo con las bacterias del lumen intestinal. Estudios recientes sugieren que alteraciones en la adquisición o composición de la flora bacteriana [96] puede influir el curso de varias enfermedades metabólicas e inflamatorias.

En la EC, la presencia prolongada de poblaciones elevadas de linfocitos TCR $\gamma\delta$ en el epitelio intestinal de pacientes que siguen una DSG [97] indica un estrés en el que podría estar implicada la interacción continua del epitelio con bacterias intestinales. La exposición del epitelio intestinal a la gliadina o prolamina similares junto con un haplotipo HLA-DQ apropiado, son dos factores necesarios, pero no suficientes, para desencadenar la EC.

Reacciones aberrantes del sistema inmunitario pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad. Investigadores del Departamento de Microbiología Clínica e Inmunología de la Universidad de Umea en Suecia, publicaron en el año 2003 un trabajo en el que estudiaron la carga bacteriana de biopsias intestinales de pacientes

celiacos tanto en actividad (aEC) como en DSG, y de individuos sanos [98], analizando la composición del glicocálix y la producción de mucinas y péptidos antimicrobianos mediante diversas técnicas. Concluyeron que existen diferencias significativas en la composición del glicocálix en la mucosa de los pacientes celíacos en comparación con los individuos sanos que podrían facilitar la adhesión bacteriana al epitelio intestinal.

Un año más tarde, se publicó otro trabajo [99] llevado a cabo por investigadores suecos, en el cual estudiaban la función metabólica de la microflora en pacientes pediátricos con EC. El análisis se llevó a cabo mediante cromatografía de los ácidos grasos de cadena corta en muestras fecales. Observaron diferencias en el metabolismo de la flora bacteriana en pacientes celíacos en comparación con los controles sanos, tanto en aEC como en DSG, lo cual indicaba que se trataba de un fenómeno independiente de la dieta, la inflamación y el estado inmunológico del paciente.

Todo esto nos lleva a pensar en una posible implicación de la flora bacteriana en la patogenia de la EC, pudiéndose barajar múltiples posibilidades [100]. Los productos bacterianos podrían estar actuando como adyuvantes sobre los sensores bacterianos del duodeno como los TLRs (*Toll-like Receptors*), disminuyendo de esta forma el umbral de activación de las células T de la lámina propia por el gluten. Otra posibilidad es que la presencia de bacterias en el intestino desencadene cierto estrés en las células epiteliales, que expresarían elevadas cantidades de MICA, convirtiéndose así en células diana para los linfocitos T citotóxicos. Por otro lado las bacterias de la microbiota podrían ser capaces de expresar algún tipo de transglutaminasas que participasen en la desaminación de la gliadina. Por último, cabría pensar que la propia flora bacteriana pueda estar interviniendo de alguna forma en la degradación de la gliadina, de forma que en el duodeno de los pacientes EC se formen péptidos, como producto de una digestión diferencial y específica, capaces de desencadenar una respuesta inmunológica innata.

1.2.3 La mucosa intestinal como órgano diana

La mucosa intestinal es la superficie mucosa más extensa del organismo. Se encuentra revistiendo el tubo digestivo y está formada por el epitelio intestinal, la lámina propia (tejido conectivo con numerosos vasos sanguíneos y linfáticos) y la submucosa (músculo liso). El epitelio intestinal representa la primera línea de defensa en el tracto digestivo ya que constituye una barrera física entre el lumen intestinal y el ambiente aséptico del intersticio. Gracias a su permeabilidad selectiva permite la absorción de nutrientes, electrolitos y agua a la vez que constituye una defensa eficaz frente a antígenos externos, microorganismos y toxinas [101].

El epitelio intestinal se compone de 5 tipos celulares principales: células columnares absortivas o enterocitos (las más abundantes), células globet, células endocrinas, células Paneth y células M [102]. La cohesión y polaridad de estas células es mantenida por una red de proteínas que forman 3 tipos de complejos de adhesión (**Figura 4**): desmosomas, uniones adherentes (AJs, *Adherens junctions*) y uniones estrechas (TJs, *Tight junctions*) [103], responsables de mantener la función selectiva de esta barrera.

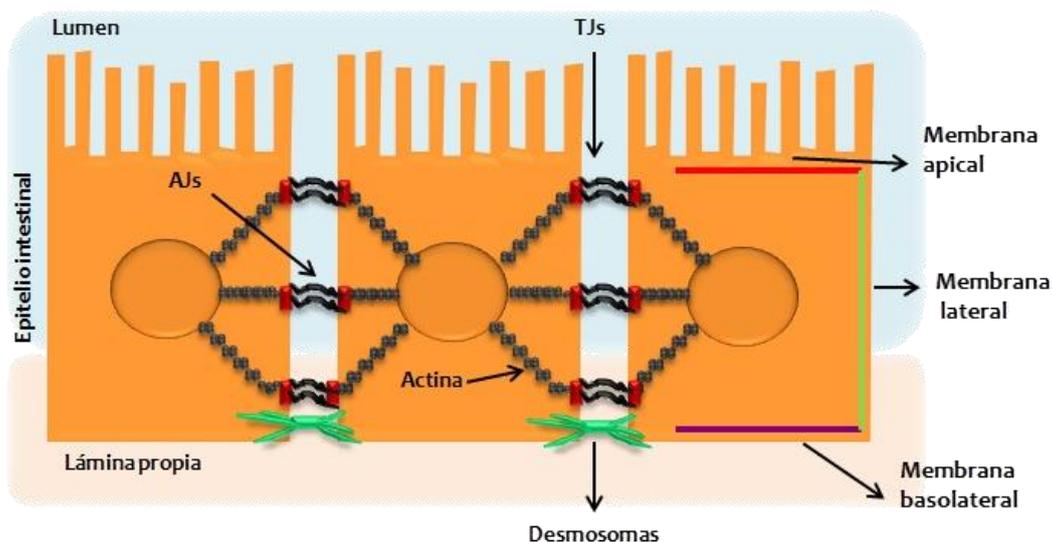


Figura 4: Complejos de adhesión de las células epiteliales. En la membrana lateral: uniones adherentes o AJs (*adherens junctions*) y en la membrana apical: uniones estrechas o TJs (*tight junctions*), ambas ancladas al citoesqueleto o a través de los filamentos de actina. En la membrana basolateral: desmosomas.

Gracias a los desmosomas y las AJs las células adyacentes se mantienen unidas de forma mecánica [104], mientras que las TJs son las responsables de sellar el espacio intercelular regulando el transporte paracelular de solutos iónicos y evitando la entrada de macromoléculas hacia la lámina propia [105]. Además, tanto las AJs como las TJs juegan un papel importante en la regulación de la proliferación, polarización y diferenciación celular del epitelio [106]. Las AJs se sitúan en los puntos de unión entre células en las membranas laterales, y se componen de proteínas transmembrana que se unen al citoesqueleto a través de proteínas adaptadoras intracelulares. Las TJs, sin embargo, forman un anillo a modo de cinturón alrededor de las células epiteliales, en los puntos de confluencia de las membranas apical y lateral. Consisten en proteínas transmembrana (occludina, claudina y moléculas de adhesión) [107-108] que interactúan en el espacio paracelular con proteínas de células adyacentes. Los dominios intracelulares de las proteínas transmembrana se unen al citoesqueleto a través de los dominios de unión de proteínas adaptadoras (*zonula occludens* ZO-1, ZO-2 y ZO-3) [109]. Las proteínas de las TJs son reguladas mediante mecanismos de fosforilación llevados a cabo fundamentalmente por kinasas y fosfatasa. Las TJs funcionan como una barrera selectiva y semipermeable.

En un individuo sano, sin alteraciones en la mucosa intestinal, el transporte de pequeñas moléculas, principalmente proteínas, hacia la lámina propia se realiza a través de dos vías principales [110-111] (**Figura 5**):

- La vía **paracelular** está controlada por las TJ las cuales forman poros de pequeño tamaño ($4-9 \times 10^{-8}$ cm) en las vellosidades intestinales y otros algo más grandes ($50-60 \times 10^{-8}$ cm) en las criptas [112]. Esta vía controla el flujo pasivo de iones y moléculas con un peso molecular inferior a 600 Da [113]. La difusión de estas moléculas está dirigida por los movimientos de agua que se generan como consecuencia del gradiente electroquímico transepitelial y los gradientes osmóticos [102].
- La **vía transcelular** permite el paso de pequeñas cantidades de moléculas antigénicas más grandes mediante un proceso activo a través de los propios enterocitos. La captación del antígeno puede ocurrir a través de las células M de las placas de Peyer [102]. Además, las células dendríticas tiene la capacidad de reconocer bacterias directamente en el lumen intestinal extendiendo sus dendritas entre las células epiteliales [114]. La vía transcelular es muy importante en la captación de partículas antigénicas como microorganismos [115] pero no parece esencial en el

transporte de las proteínas de la dieta.

Diversos estudios indican que en condiciones normales, las macromoléculas del lumen pueden: i) ser endocitadas por los enterocitos, ii) degradadas en el compartimento lisosomal y iii) alcanzar la lamina propia por la membrana basolateral, haciéndolo el 90% como péptidos libres o complejos de péptidos-MHCII liberados en exosomas y el 10% restante como proteínas intactas [102, 116]. Una vez en la lámina propia, los péptidos o los complejos en exosomas pueden ser reconocidos por células dendríticas y viajar por la vía linfática hasta los nódulos linfáticos donde podrán desencadenar una respuesta tanto reguladora como inflamatoria [117].

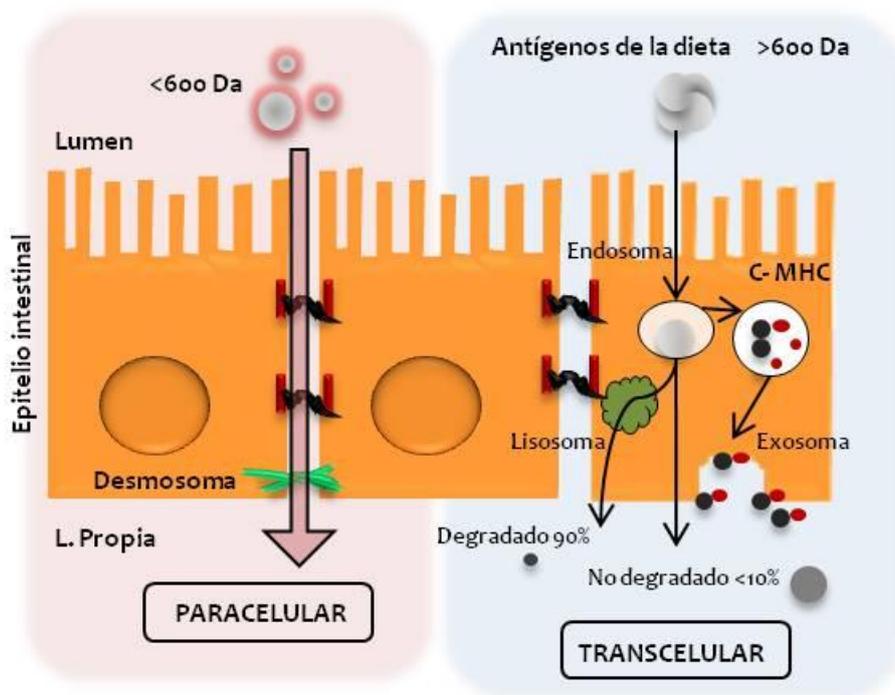


Figura 5: Vías de transporte a través del epitelio intestinal en condiciones normales. Las moléculas pequeñas (< 600 Da) atraviesan el epitelio intestinal mediante el transporte paracelular, controlado principalmente por las uniones estrechas o *tight junctions* (TJs), las cuales forman poros de diferentes tamaños que restringen el paso de las moléculas. Las moléculas de < 600 Da alcanzan la lámina propia a través de la vía transcelular en tres posibles estados: tras ser endocitadas en la membrana apical de los enterocitos donde se degradan parcialmente. De ahí, (a) el 90% pasan a los lisosomas donde son degradadas casi totalmente, (b) una pequeña fracción de moléculas (10%) prácticamente intactas, desde los endosomas, atraviesan la membrana basolateral de los enterocitos alcanzando la lámina propia. Además, los endosomas pueden unirse a compartimentos ricos en complejos mayor de Histocompatibilidad (C-MHC), provocando la formación de exosomas ricos en complejos péptido-MHC, que son liberados a la lámina propia pudiendo ser reconocidos por células dendríticas, que a su vez estimulan a las células T desencadenando una respuesta inmune.

En la última década se ha observado que existe una correlación entre la ruptura de esa primera barrera intestinal y el desarrollo de enfermedades autoinmunes e inflamatorias. En la mayoría de las enfermedades digestivas se produce una alteración de la permeabilidad intestinal, y la EC no es una excepción [111].

Los estudios de permeabilidad intestinal en la EC se remontan a los años 60 [118], y la mayoría de ellos utilizan como modelo experimental de epitelio intestinal la línea celular Caco-2, procedentes de adenocarcinoma colorectal humano, desarrolladas por el Dr. Jorgen Fogh, del Instituto de investigación del cáncer Sloan-Kettering en Nueva York. Estas células, cultivadas bajo las condiciones apropiadas, se diferencian y polarizan de manera que su fenotipo, morfología y funcionalidad son muy similares a los enterocitos del intestino delgado [119]. Debido a que crecen de forma exponencial y formando monocapas, con uniones estrechas entre las células, las células Caco-2 han sido ampliamente utilizadas en estudios de permeabilidad celular [120-122].

La permeabilidad intestinal está regulada por múltiples factores, como la apoptosis de las células epiteliales, la secreción de citocinas, las células del sistema inmune y factores exógenos. Se cree que una disfunción en la barrera intestinal puede ser crítica a la hora de hablar de la predisposición de un individuo a sufrir algún tipo de enfermedad autoinmune como puede ser la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), alergia alimentaria, diabetes y la enfermedad celíaca (EC). Existen mediadores principales en los procesos de inflamación intestinal como el IFN γ [123-124] y TNF α [125] que promueven la reorganización de las proteínas que componen las uniones estrechas, a través de reacciones de fosforilación, afectando de forma negativa a la función de la barrera intestinal. Además, datos experimentales y clínicos demuestran que citocinas como la IL-4 e IL-13 [126] inducen un aumento en la permeabilidad intestinal.

Los pacientes con EC presentan una elevada permeabilidad intestinal junto con una alteración morfológica de las uniones estrechas si se les compara con individuos control no-EC. Además, estas alteraciones persisten en pacientes asintomáticos que siguen una DSG. Los pacientes con EC desarrollan una respuesta inmune anormal frente a los péptidos derivados de gluten. Esta respuesta, se inicia cuando los péptidos alcanzan prácticamente intactos la lámina propia, debido a un mecanismo de transporte poco conocido hasta ahora. Existen datos que demuestran que el incremento de la

permeabilidad intestinal es anterior a la enfermedad en sí misma [127], de hecho, familiares directos de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal o enfermedad celiaca presentan una mayor permeabilidad intestinal. La gliadina ha demostrado tener un efecto directo sobre la zonulina, estimulando su producción e induciendo un incremento de la permeabilidad del intestino [128]. En este caso, la mayor parte de la gliadina consigue alcanzar la lámina propia a través de la vía paracelular. Además, se ha visto que la gliadina se une al receptor CXCR3 [129] presente en las células epiteliales, regulando la producción de zonulina mediante un mecanismo dependiente de MyD88. La distribución de CXCR3 en el tejido intestinal de pacientes con EC e individuos control no EC es cualitativamente similar, pero su nivel de expresión es más elevado en los pacientes con EC.

La vía paracelular no es el único mecanismo propuesto para la entrada de los péptidos derivados del gluten de forma intacta hasta la lamina propia. Un grupo de investigación francés liderado por Martine Heyman, ha publicado recientemente varios trabajos en los cuales proponen un mecanismo protector a través de la vía transcelular que permite el paso de los péptidos sin que éstos sean degradados por los lisosomas y exosomas [130]. La EC está asociada con una elevada concentración de anticuerpos IgA anti-gliadina en el lumen intestinal [131]. La inmunoglobulina A secretora (SIgA) es el componente efector mejor definido del sistema inmune de la mucosa intestinal. En un individuo sano, el transporte de los anticuerpos IgA consiste principalmente en un mecanismo de transcitosis desde la membrana basal hacia la membrana apical, lo que permite la liberación de la IgA secretora (SIgA) al lumen intestinal [132], donde confiere protección frente a patógenos y antígenos procedentes de la dieta. Sin embargo, Heyman *et al* han conseguido evidencias que apuntan a la existencia de una retrotranscitosis de la IgA en la EC, de manera que el transporte se realizaría desde la membrana apical hacia la membrana basal de los enterocitos. En un trabajo publicado en el año 2001, Moura *et al* [133] identificaron al receptor de las transferrina CD71 como un receptor de la IgA. En individuos sanos, este receptor se expresa en las membranas baso-laterales de las células del epitelio intestinal que forman las criptas, sin embargo, en los pacientes con enfermedad celiaca, este receptor se expresa en la membrana apical de los enterocitos, principalmente en las vellosidades intestinales [102]. Por lo tanto, cabría la posibilidad de que en la EC se produzca el paso de los péptidos derivados del gluten hacia la lámina propia mediante un mecanismo de

retrotranscitosi del complejo IgA-péptidos de gliadina a través del receptor CD71 (**Figura 6**), lo que provocaría una sobre estimulación del sistema inmune de la mucosa intestinal.

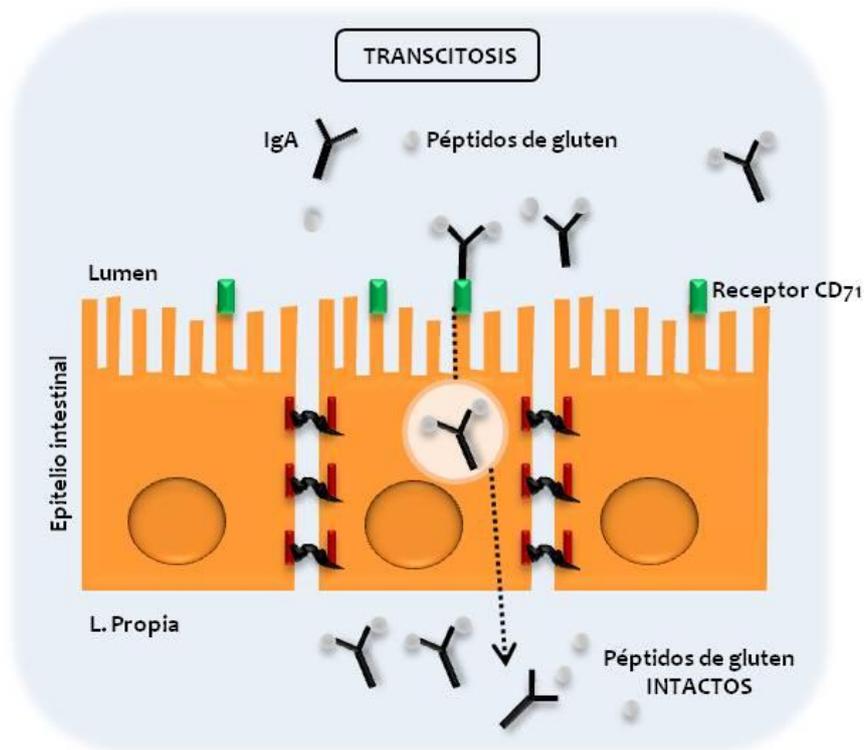


Figura 6: Transporte de los péptidos de gluten a través del epitelio intestinal en la Enfermedad Celíaca mediante retrotranscitosi mediada por IgA. La IgA es una inmunoglobulina que en condiciones normales es secretada en el lumen intestinal con el principal objetivo de proteger al organismo de los microbios y antígenos de la dieta presentes en el tracto intestinal. En condiciones patológicas como la Enfermedad Celíaca, puede producirse un retrotransporte anormal de la IgA secretora (SIgA) permitiendo el paso de bacterias o antígenos de la dieta hacia la lámina propia. En el lumen intestinal, la IgA por un lado se une a los péptidos derivados de la digestión del gluten, y por otro, es reconocida por su receptor CD71 expresado en la membrana apical de los enterocitos. El complejo IgA-péptidos es endocitado y liberado por la membrana basal de los enterocitos, alcanzando la lámina propia sin sufrir ningún tipo de degradación. De esta manera los péptidos de gluten atraviesan el epitelio intestinal de forma intacta, desencadenando la respuesta inmune característica de la EC.

El incremento de la permeabilidad intestinal en la EC es un hecho indiscutible, aunque a día de hoy no se conoce con certeza si es la causa o una consecuencia de la propia enfermedad [102]. Existe una gran controversia entre cuál es el mecanismo de transporte a través del cual los péptidos de gluten alcanzan la lámina propia. Lo más probable es que se trate de una combinación de varios factores.

1.3 Clínica y diagnóstico de la Enfermedad Celiaca

Hace años, la EC solía presentarse como un desorden alimenticio en individuos de cualquier edad, afectando especialmente a los niños de entre 1 y 5 años. Sin embargo, en la actualidad cada vez es más frecuente el diagnóstico de la EC en adultos, donde además suele manifestarse con un cuadro clínico atípico, con manifestaciones extra- intestinales asociadas a otras patologías, lo que dificulta aún más su diagnóstico.

En la forma clásica de la EC predomina la sintomatología gastrointestinal: diarrea malabsortiva, dolor abdominal, flatulencia, pérdida de peso, vómitos, atrofia vellositaria, diarrea, distensión abdominal e irritabilidad. Suele presentarse entre los 6 y 24 meses de edad en niños y entre los 30 y 50 años en adultos. Sin embargo, existen situaciones en la que las manifestaciones digestivas están ausentes u ocupan un segundo lugar. Estas formas atípicas incluyen manifestaciones extra-intestinales que pueden ser orales [134], cutáneas, hematológicas [135-136], neurológicas [137], articulares, hepáticas, endocrinológicas, ginecológicas [138] y psiquiátricas [139], entre las que predomina la anemia ferropénica [140] tanto en niños como en adultos.

En los últimos años se ha demostrado la existencia de formas ocultas de la enfermedad celiaca. Al igual que ocurre con la epidemiología, las formas de presentación de la EC se representan con el modelo de iceberg [27], descrito en los años 90 por Logan (**Figura 1**). Solamente una pequeña porción del iceberg es visible, y representa las formas sintomáticas de la enfermedad, tanto típicas como atípicas. Sin embargo la gran parte del iceberg que permanece oculta bajo el agua, representa las formas no sintomáticas de la enfermedad celiaca: Silente, latente y potencial [141].

En la EC silente, no existen manifestaciones clínicas pero sí lesiones típicas de la enfermedad en la mucosa del intestino delgado. Por esta razón, su diagnóstico suele ser fruto de la casualidad o de estrategias de despistaje realizadas en estudios familiares o poblacionales ya que suelen presentar los marcadores serológicos característicos de la EC. Un estudio realizado en 2002 por Cilleruelo [31] concluyó que en España la incidencia de la EC Silente es de 1/281 individuos. Es más frecuente en familiares de primer grado de pacientes celiacos y puede cursar de manera asintomática durante

varios años. Esta forma corresponde a gran parte de los adultos con diagnóstico de EC en la infancia que no siguen la DSG [142]. Debido a la ausencia de manifestaciones físicas, es fundamental hacer un seguimiento clínico continuo de estos pacientes mediante marcadores serológicos, incluso con una biopsia intestinal en algunos casos [143].

A diferencia de la EC silente, los pacientes con EC latente no presentan manifestaciones clínicas pero tampoco las lesiones típicas de la enfermedad, ni niveles positivos en alguno de los marcadores serológicos. En algunos casos se observa un aumento de linfocitos intraepiteliales (LIEs), y aunque con el paso del tiempo deberían presentar atrofia vellositaria, la biopsia tiene morfología normal al momento del diagnóstico. Suele darse en familiares de primer grado de pacientes celíacos que, de la misma manera que en la EC silente, deben ser sometidos a controles periódicos. Esta tipología es la más difícil de diagnosticar.

La EC potencial es la forma de presentación con más controversia. En este caso, los pacientes no presentan alteraciones histológicas en la biopsia intestinal, pero presentan algún marcador positivo propio de la EC (generalmente los marcadores genéticos) o un aumento de LIEs. Se especula que pueden desarrollar potencialmente la enfermedad, que podría estar inducida por factores ambientales no identificados hasta el momento [144]. Este sería el grupo más numeroso de todos.

Existen casos en los que la atrofia vellositaria e hiperplasia de criptas persiste después de 12 meses en DSG o hay un cuadro clínico grave que requiere reevaluación del paciente. Es lo que se conoce como EC refractaria, la cual es más frecuente en mujeres, muy rara vez en menores de 30 años y con mayor frecuencia en mayores de 50 años. En estos casos es importante confirmar el diagnóstico de la enfermedad y evaluar las posibles explicaciones a la falta de respuesta a la dieta (ingesta de gluten, diagnóstico erróneo, intolerancia a la lactosa, sobrecrecimiento bacteriano o síndrome de intestino irritable entre otras).

Existen numerosas enfermedades asociadas a la EC, como son las enfermedades autoinmunes (Diabetes tipo I, Tiroiditis autoinmune, Hepatitis autoinmune, Miastenia,

Cirrosis biliar, Psoriasis y Síndrome de Sjögren) y otras como Síndrome de Down, Síndrome de Turner y Síndrome de Williams, que complican aún más el diagnóstico de la EC, convirtiéndolo en un auténtico reto para los profesionales.

1.3.1 Criterios diagnósticos

Hace años, cuando la EC era considerada una enfermedad rara, su diagnóstico se basaba en la detección de los síntomas típicos gastrointestinales, en la confirmación mediante una biopsia del intestino delgado y en esquemas de retirada-reintroducción del gluten [145], que requerían la realización de un mínimo de tres biopsias intestinales.

Actualmente los criterios diagnósticos de la EC se basan en la sintomatología clínica, los marcadores genéticos, las determinaciones serológicas y los hallazgos histopatológicos de las biopsias duodenales, que junto con una buena respuesta a la dieta libre de gluten, constituyen la base fundamental para su confirmación en la mayoría de los casos. El amplio abanico de formas de presentación clínica hace que en ocasiones las determinaciones genéticas, serológicas e histológicas no sean concluyentes. En estos casos se permite la retirada del gluten para observar si se produce una buena respuesta antes de determinar un diagnóstico definitivo.

En términos generales, se puede decir que la enteropatía inducida por el gluten cursa con daño de los enterocitos por productos de degradación del gluten, que se manifiesta en última instancia por una atrofia vellositaria con aplanamiento de la superficie mucosa. Dado que el desarrollo de la EC es un proceso dinámico, el cuadro histológico varía ampliamente dependiendo del estadio clínico de la enfermedad y su severidad.

Hasta el momento, la biopsia duodenal sigue siendo la clave en el diagnóstico de la enfermedad. El informe final anatómo-patológico debe incluir los cambios en la arquitectura de las vellosidades y las criptas, así como el número de linfocitos intraepiteliales (LIEs). Para la confirmación del diagnóstico es necesaria la existencia de un consenso entre 4 y 6 biopsias tomadas antes del inicio de la DSG [146]. El incremento de LIEs es el primer y más sensible hallazgo producido por el gluten en la mucosa del intestino y constituye, por sí solo, la característica histopatológica más

relevante, incluso la única en las formas latentes de la enfermedad. Los LIEs son reconocidos fácilmente mediante una tinción con hematoxilina-eosina, y la presencia de más de 25 linfocitos por 100 enterocitos superficiales [147-148] o situados en la parte superior de la cripta es considerada como un incremento significativo.

En cuanto a los enterocitos, en las fases iniciales o latentes, no presentan cambios llamativos pero cuando existe un daño severo se produce una alteración del borde en cepillo, basofilia, vacuolación citoplasmática y pérdida de la polaridad lo que hace que adopte un aspecto de epitelio pseudo-estratificado [149].

La atrofia vellositaria es la característica más llamativa de la EC debido a que es fácilmente reconocible tanto por endoscopia como en cortes histológicos. Se valora la relación vellosidad/cripta si se identifican 4 o más criptas paralelas, no tangenciales y adyacentes [150]. El cociente normal vellosidad/cripta es mayor de 2,5 de manera que cocientes inferiores se consideran atrofia. Existen tres clasificaciones histológicas para la EC: Marsh [151], Marsh-Oberhuber [152] y Corazza [148]. Actualmente la clasificación modificada de Marsh (**Tabla 7** y **Figura 7**) es la más aceptada para la clasificación de la lesión intestinal, y permite la comparación de distintas fases de la enfermedad en el mismo paciente así como entre datos obtenidos por distintos centros.

	TIPO 0	TIPO 1	TIPO 2	TIPO 3a	TIPO 3b	TIPO 3c
LESIÓN		INFILTRATIVA	HIPERPLÁSICA	DESTRUCTIVA	DESTRUCTIVA	DESTRUCTIVA
LIE*	<25	>25	>25	>25	>25	>25
CRIPAS	Normal	Normal	Hiperplasia	Hiperplasia	Hiperplasia	
VELLOSIDADES	Normal	Normal	Normal	Atrofia leve	Marcada atrofia	Mucosa plana

Tabla 7: Clasificación modificada de Marsh de los diferentes grados de lesión intestinal en la Enfermedad Celiaca. LIE: número de linfocitos intraepiteliales por cada 100 células epiteliales.

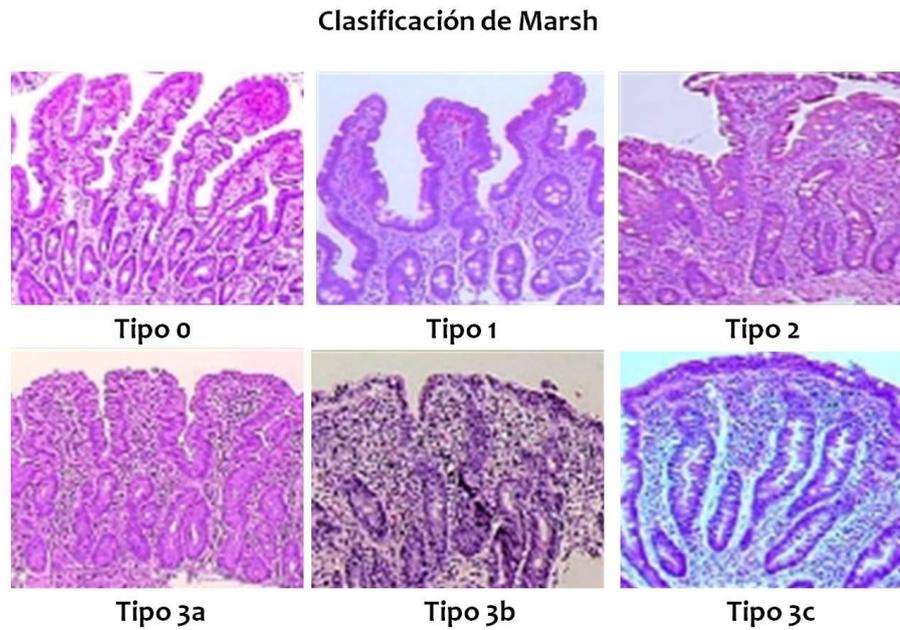


Figura 7: Cortes histológicos de la mucosa duodenal en función de la clasificación modificada de Marsh de los diferentes grados de lesión intestinal en la Enfermedad Celíaca.

1.3.2 Pruebas serológicas

Los marcadores serológicos específicos de la EC constituyen uno de los 3 pilares del diagnóstico de esta enfermedad, además de ofrecer varias ventajas con respecto a la toma de la biopsia duodenal. A nivel metodológico, las técnicas empleadas para los estudios serológicos son menos invasivas para el paciente, menos costosas y más rápidas en la obtención de resultados. Además, son muy útiles en los estudios de cribado poblacional, de seguimiento de la correcta adherencia a la dieta sin gluten y del seguimiento propio de la evolución del paciente celiaco.

Ya en la década de los 60 [153] se observó la existencia, en enfermos celiacos, de anticuerpos séricos circulantes que disminuían tras instaurar una dieta exenta de gluten. Los anticuerpos antigliadina (AAG) fueron la primera herramienta serológica útil para el diagnóstico de la EC. Los AAG reconocen determinantes antigénicos de la α -gliadina muy conservados y compartidos con las otras fracciones (gliadinas β , γ y ω).

Aunque con menor frecuencia, también aparecen en otras patologías (enfermedad de Crohn e intolerancias alimentarias) e incluso en controles normales, por lo que no pueden considerarse específicos de la EC [154]. Su detección indica un aumento de la permeabilidad intestinal y una sensibilización al gluten, pero no necesariamente la presencia de enteropatía. La concentración de AAG no está homogéneamente distribuida, cambia con la edad y está influida por factores genéticos.

Posteriormente al descubrimiento de los AAG, se pusieron en evidencia, en los pacientes celíacos no tratados, otras respuestas humorales cuya detección requiere la utilización de un sustrato tisular. Son los anticuerpos antireticulina (AAR), los anticuerpos antiyeyuno (AAY) y los anticuerpos antiendomiso (EmA). Para la determinación de todos ellos se emplean sustratos antigénicos distintos: riñón, estómago e hígado de roedor en el caso de los AAR, yeyuno humano para los AAY y contra la sustancia intermiofibrilar del músculo liso (endomiso) procedente en un principio del esófago del mono verde africano y posteriormente del cordón umbilical para los EmA [155]. La aparición de los anticuerpos antiendomiso supuso una revolución en el desarrollo de pruebas serológicas para la EC. Los anticuerpos EmA, aunque su determinación a nivel metodológico era más elaborada, superaban la eficiencia de todos los anticuerpos utilizados anteriormente.

El posterior aislamiento e identificación del principal antígeno del endomiso (la transglutaminasa tisular TGt) [156] permitió el desarrollo de técnicas fácilmente automatizables y con ello la generalización de su uso y la posibilidad de completar los estudios epidemiológicos que se habían iniciado con los EmA. Diversos trabajos han corroborado que los anticuerpos anti-TGt-IgA y los EmA-IgA son el mismo anticuerpo determinado frente a sustratos distintos.

La principal utilidad de los marcadores serológicos es ayudar en la selección previa de aquellos pacientes con una alta posibilidad de padecer la EC que deberá ser confirmada mediante una biopsia intestinal. En la detección de anticuerpos en sangre frente a los antígenos previamente citados, se estudian dos de las inmunoglobulinas más abundantes en sangre: IgG e IgA.

1.3.2.1 Marcadores serológicos actuales

En la actualidad, los marcadores serológicos más utilizados en el diagnóstico de la EC son los anticuerpos IgA anti-TGt, con una sensibilidad cercana al 100% y una especificidad de entre el 89% y 96% y los anticuerpos IgA anti-endomisio con una sensibilidad y especificidad superiores al 95% [146]. Uno de los ensayos inmunológicos más empleados en la determinación de los anticuerpos anti-TGt, es el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) [157], cuyo origen se remonta a los años 60. Mediante la fijación del antígeno conocido a una fase sólida, el ELISA permite detectar en una muestra de suero o plasma sanguíneo, anticuerpos que reconozcan de forma específica ese antígeno que a su vez, son reconocidos por un segundo anticuerpo marcado con una enzima la cual produce una reacción colorimétrica cuando entra en contacto con su sustrato. Aunque el procedimiento es rutinario y sencillo, involucra a un gran número de variables que deben ser ajustadas correctamente. Existen diferentes tipos de ELISA que permiten detectar cualquiera de los dos elementos que forman el complejo antígeno-anticuerpo, lo que hace del ELISA una técnica con diversas aplicaciones en el diagnóstico clínico, detección viral y búsqueda de anticuerpos monoclonales entre otras.

Desde el desarrollo de la biotecnología en los años 90 y con el objetivo de aumentar la especificidad de los marcadores serológicos, los antígenos recombinantes han sido ampliamente utilizados en el diagnóstico de diversas enfermedades mediante la detección de anticuerpos específicos. Sin embargo, los antígenos recombinantes no son tan inmunoreactivos como los correspondientes antígenos humanos y han supuesto algunos problemas en su aplicación diagnóstica [158]. Durante la expresión de las proteínas en las bacterias, se pierden tanto las modificaciones post-transcripcionales como las estructuras adoptadas por las proteínas antigénicas [159]. Además, la producción de antígenos recombinantes en grandes cantidades y de buena calidad es un proceso laborioso, costoso y suele dar problemas en la reproducibilidad de los resultados, principalmente inter ensayo [160].

Por esta razón el uso de péptidos sintéticos en el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico es cada vez más común. Estos péptidos simulan los epítomos específicos de

diferentes proteínas antigénicas y al ser productos químicamente bien definidos, permiten una disminución de las reacciones inespecíficas y una mejora de la reproducibilidad. Además, a diferencia de los antígenos recombinantes, evitan el trabajar con material infeccioso.

Estos péptidos ofrecen la posibilidad de modificar su estructura química mediante diferentes métodos [161] como a) la unión covalente de biotina, ácidos grasos, proteínas portadoras o residuos de cisteína, b) la incorporación de modificaciones post-translacionales como fosforilaciones o citrulinaciones, c) ciclación y d) la multimerización de la secuencia del epítipo.

En los últimos 20 años se han utilizado una gran cantidad de péptidos sintéticos con el objetivo de aumentar la sensibilidad y especificidad de los ensayos inmunológicos destinados al diagnóstico, utilizando como sustratos tanto proteínas recombinantes como nativas [162-164]. En la actualidad existen numerosos sistemas de diagnóstico de enfermedades tanto de carácter viral como parasitario y autoinmune, basados en péptidos sintéticos. Algunos ejemplos son: Epstein-Barr virus [165], Hepatitis C [166], *Chlamydia trachomatis* [167] y artritis reumatoide [168].

Los métodos disponibles en la actualidad para la síntesis de péptidos sintéticos pueden agruparse en [161]: métodos experimentales y métodos computacionales. Los métodos computacionales se basan, generalmente, en las propiedades fisicoquímicas de la estructura de las proteínas, es decir, en la capacidad hidrofílica, accesibilidad a la superficie y la movilidad de los segmentos. Estos métodos son los más económicos pero a su vez los que menos éxito han tenido hasta el momento. En cambio, los métodos experimentales son los más utilizados, aunque eso no quiere decir que estén exentos de problemas.

A la hora de desarrollar un péptido sintético las dos características fundamentales a tener en cuenta son: su capacidad de adsorción a la fase sólida y la especificidad y sensibilidad en la interacción con el anticuerpo. La adsorción puede ser potenciada de varias formas:

- 1) Unión covalente a proteínas portadoras [169-170]: BSA, KLH y OVA son las más utilizadas. Aunque en ocasiones la proteína portadora enmascara el epítipo y dificulta su unión al anticuerpo.
- 2) Unión no covalente, utilizando por ejemplo la unión Biotina-Avidina [171]. El

problema en este caso está en la pérdida de control de la orientación del péptido en la superficie de la placa.

- 3) Unión a un motivo CGG (Cisteína-Glicina-Glicina) [172]. Esta es la forma en la que el péptido se mantiene más fiel a su conformación nativa y además permite la polimerización de los mismos.
- 4) Unión a ácidos grasos [161, 173] que orientan y fomentan la adsorción. Los más utilizados son el ácido palmítico y el mirístico que favorecen las condiciones de hidrofobicidad y además separan el péptido de la superficie de la placa, concediéndole un aspecto tridimensional que facilita la unión al anticuerpo.
- 5) Unión covalente del péptido a la fase sólida [174-175], que requiere una pre-activación del péptido o de la fase sólida. El péptido puede pegarse o por su grupo amino o por el grupo carbonilo. Este método permite una mejor orientación del péptido en la placa. Se usa principalmente cuando no hay otra manera de que el péptido se adsorba a la fase sólida.

Para aumentar la sensibilidad y especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo se emplean péptidos sintéticos multiméricos [176-178] en lugar de monoméricos, de forma que se exponen diferentes epítomos en cada proteína sintética. Pese a que en ocasiones los diferentes epítomos pueden competir por la adherencia a la fase sólida e incluso modificar su distribución espacial, este tipo de estructuras son cada vez más empleadas en el desarrollo de sistemas de diagnóstico debido a que permite detectar diferentes anticuerpos contra más de un epítomo de forma simultánea. El orden de la localización de los diferentes epítomos en la molécula determina la correcta exposición a los anticuerpos y por lo tanto define la antigenicidad del péptido, la cual aumenta cuando los epítomos se unen de forma covalente a una estructura protéica con composición química bien conocida, que puede ser lineal, ramificada o cíclica. Los péptidos cíclicos [179] simulan mejor la estructura nativa del péptido, de manera que suelen ser más eficaces en el desarrollo de antígenos sintéticos.

1.3.2.2 Principales problemas de las pruebas serológicas

Los anticuerpos IgA reconocen de una forma más específica el antígeno correspondiente y por ello son los anticuerpos más estudiados. Sin embargo son la principal causa de resultados falsos negativos en pacientes con déficit selectivo de IgA (DSIgA) o deficiencia severa o ausencia total de la clase IgA de inmunoglobulinas en plasma sanguíneo y secreciones. Es la más común de las inmunodeficiencias primarias. La sintomatología puede ser de lo más variado, en función de si se presenta como una enfermedad asociada a otra. Los individuos con esta deficiencia, producen sin problema todas las otras clases de inmunoglobulinas, y la función de los linfocitos T son normales o casi normales. Actualmente la DSIgA tiene una incidencia de 1:500 en caucásicos, siendo más común, a diferencia de la EC, en hombres que en mujeres [180]. Se considera deficiencia selectiva de IgA cuando los niveles en sangre de dicha inmunoglobulina están por debajo de 0,07 g/l, mientras que los niveles de IgG e IgM son normales. Durante los primeros años de vida puede ser una deficiencia transitoria que no se diagnostica de forma definitiva hasta los 4 años de edad.

Los pacientes con DSIgA presentan un riesgo entre 10 y 20 veces mayor de desarrollar la Enfermedad Celiaca. Está demostrado que la presencia de los alelos HLA-DQ2 es más frecuente en individuos con deficiencia selectiva de IgA que en el resto de la población [181]. La deficiencia selectiva de IgA está fuertemente asociada al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), en particular con la región HLA-DR7, DQ2 y DR1, DQ5 [182]. En estos pacientes el diagnóstico de la enfermedad puede resultar difícil, dado que los ensayos basados en IgA específica suelen salir negativos y las determinaciones de anticuerpos específicos IgG no son suficientemente fiables. La combinación de la enfermedad celiaca y la deficiencia selectiva de IgA en un mismo paciente suele ser rara en individuos asintomáticos, pero es muy frecuente en niños sintomáticos (aproximadamente el 2%). Por lo tanto, frente a un niño con síntomas de enfermedad celiaca, es muy importante evaluar los niveles totales de IgA para que los resultados de los anticuerpos IgA anti transglutaminasa y anti endomisio sean fiables. En estos casos se recomienda el estudio de IgG anti-TG [183].

Existe una fuerte asociación entre la EC, generalmente en su forma silente, y diferentes trastornos autoinmunes [184]. Diferentes estudios han demostrado que la

enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es más frecuente en pacientes celíacos que en la población en general [185-186]. Los anticuerpos anti-TGt, a pesar de tener una elevada sensibilidad en el diagnóstico de la EC, han sido identificados en EII, sugiriendo una baja especificidad de los mismos en el diagnóstico de la EC. Una posible explicación es la presencia de lesiones tisulares y actividad inflamatoria en este tipo de pacientes [187-188]. Es probable que para que se produzca un incremento de los niveles de anticuerpos anti-TG y anti-endomisio en pacientes con EII como Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa, sea necesario un elevado grado de atrofia intestinal.

La diabetes mellitus tipo 1 es otra condición autoinmune asociada a la EC [189]. La prevalencia de la EC es mayor en pacientes con diabetes tipo 1 y alrededor del 4-7% de los pacientes con diabetes presentan también EC. Esta coexistencia se debe, en parte, al hecho de que ambas enfermedades comparte la misma predisposición genética HLA-DQ2 y DQ8. En el 90% de los casos el diagnóstico de la diabetes es anterior al de la EC aunque debería ser al contrario.

Por otro lado, los niveles de anticuerpo IgA en plasma aumenta con la edad en ambos géneros, y además se ven influidos por la época estacional, siendo mayores en invierno que en el resto del año [190].

1.3.3 Marcadores genéticos

Las nuevas guías para el diagnóstico de la EC ESPGHAN 2012 [191] recomiendan que el tipaje HLA DQ2 y DQ8 debe realizarse mediante el estudio de los 4 alelos de riesgo (HLA-DQB1*02 y *0302, y DQA1*05 y *03) por técnicas de biología molecular (PCR) y no por técnicas serológicas. La determinación de los haplotipos extendidos, incluyendo los genes del DRB1[192-193], podrían definir una gradación de la susceptibilidad, aunque está por definir su trascendencia clínica. Se recomienda [191] realizar el tipaje HLA-DQ2 y DQ8 en: i) casos con diagnóstico incierto de la EC (marcadores serológicos negativos o mínimo grado de lesión), ii) casos con índice de sospecha de EC elevado (clínica compatible, IgA anti-endomisio positivos o IgA anti-TGt 10 veces superiores al valor alto de referencia) para poder realizar el diagnóstico sin necesidad de biopsia intestinal y iii) despistaje de grupos de riesgo.

En cualquier caso, los individuos pertenecientes a grupos de riesgo con marcadores genéticos de EC positivos deben someterse a seguimiento clínico y analítico periódico, ya que un resultado negativo de la serología no implica una disminución del riesgo.

La mayor ventaja de la determinación de los alelos de riesgo de la EC es su alto valor predictivo negativo.

1.4 Tratamiento de la Enfermedad Celiaca y monitorización de la dieta sin gluten

Hasta el momento, el único tratamiento seguro y eficaz para la EC es el seguimiento de por vida de una dieta sin gluten (DSG) estricta que consiste en eliminar de la dieta las proteínas del endospermo de trigo (especialmente gliadinas y gluteninas) y de sus homólogos en la cebada (hordeínas), el centeno (secalinas), en algunas variedades de avena (aveninas), los híbridos de estos cereales (como kamut y triticale) y sus derivados (almidón y harina entre otros). Existen algunos estudios que sugieren una elevada tasa de mortalidad en pacientes que no son tratados con una DSG [194].

En la mayoría de los casos, principalmente aquellos con EC clásica y EC silente, la correcta adherencia a la DSG conlleva a una remisión total de la enfermedad. En pocos meses se observa una recuperación rápida y completa de la arquitectura normal y la función de la mucosa del intestino delgado, junto con la remisión de los síntomas y la normalización de los marcadores serológicos. Sin embargo cuando se trata de pacientes con EC latente y EC potencial, la evaluación de la efectividad de la DSG resulta mucho más complicada [195].

Evitar la ingesta de gluten es una tarea difícil debido a que una gran variedad de productos, como por ejemplo los derivados cárnicos, salsas, dulces y medicamentos pueden contener cantidades significativas de las proteínas de gluten de forma más o menos inadvertida. Además, la DSG puede tener también consecuencias negativas en forma de deficiencias nutricionales como hierro, calcio, magnesio, cinc, vitamina D, vitamina B o ácido fólico, que se resuelven mediante la administración de suplementos [196]. El paciente celiaco debe adherirse a la DSG de manera estricta, sin embargo entre

el 32,6% y el 55,4% de los pacientes celíacos comenten transgresiones en la dieta [197] y alrededor del 5-10% de los pacientes celíacos no responden bien a la DSG [198], desarrollando en el 1-2% de los casos, la EC refractaria, caracterizada por una malabsorción y atrofia vellositaria permanente a pesar de eliminar el gluten de la dieta [199-200].

A nivel internacional, existe una Comisión dependiente de la Organización Mundial de la Salud encargada de las normativas para la identificación y control de los alimentos (*Codex Alimentarius Commission, FAO-WHO Food Standard Programme*). En 1981 se propuso el uso de dos límites para la identificación de productos para consumo por parte de los celíacos: 20 ppm de gluten en productos naturalmente libres de gluten, y 200 ppm de gluten en productos manufacturados como libres de gluten, siendo ppm las siglas de “partes por millón”, unidad que hace referencia a 1mg de gluten por 1kg de producto. Estos límites están en continua revisión, pero actualmente se considera que un alimento es libre de gluten cuando contiene menos de 20ppm de gluten.

Es muy difícil establecer la dosis máxima de gluten tolerada por los pacientes celíacos. En un trabajo realizado por Catassi *et al* [201], se determinó que la ingesta de 50mg de gluten por día durante 3 meses era suficiente para generar los cambios histológicos característicos de la EC en estos pacientes, teniendo en cuenta siempre que el contenido de prolaminas varía en función de cada cereal.

La monitorización de la adherencia del paciente celíaco a la DSG y de su correcta evolución es muy importante y se realiza mediante técnicas que permiten la cuantificación del contenido de gluten en los alimentos y el cumplimiento de la normativa vigente, mediante el seguimiento periódico del paciente y la determinación de anticuerpos séricos (anti-endomisio y anti-transglutaminasa) que constituyen un buen indicador de las transgresiones dietéticas [183]. Se ha observado que los pacientes celíacos con manifestaciones clínicas se adhieren mejor a la DSG ya que pueden reconocer la mejoría secundaria al tratamiento, sin embargo en las formas asintomáticas de la enfermedad, EC silente y EC latente, es más difícil evaluar la eficacia de la dieta [202-203].

Los anticuerpos anti-transglutaminasa son, hasta el momento, los marcadores serológicos estándar tanto en el diagnóstico de la enfermedad como en el seguimiento

de la DSG debido a la relación directa entre los niveles de anticuerpos anti-TG en sangre con el grado de atrofia intestinal en la escala de Marsh [204]. Tanto los anticuerpos IgA anti-TGt como IgA anti-endomisio, son los más empleados en la monitorización de la DSG. En un estudio publicado en el año 2002 [205], Di Domenico MR *et al*, estudiaron la normalización de los niveles de ambos anticuerpos en pacientes celíacos tras 1 año en DSG. Observaron que los resultados en ambos anticuerpos a tiempo cero era casi absoluta (98,7%) y de 85,7% tras los 12 meses en DSG. Sin embargo, el 28,6% de los pacientes presentaban niveles positivos de ambos anticuerpos.

Otro método de seguimiento de la DSG descrito recientemente y por primera vez por Comino y colaboradores [206] es la detección del péptido inmunogénico derivado del gluten 33-mer en muestras de heces mediante un ELISA competitivo basado en el anticuerpo monoclonal G12 [207]. Este método no invasivo, permite correlacionar la cantidad de gluten excretado con la cantidad de gluten ingerido con una elevada sensibilidad.

Capítulo II

Justificación

2.1 Justificación

La enfermedad celiaca se caracteriza por una etiología multifactorial, con un agente desencadenante que son las prolaminas de trigo, cebada, centeno y probablemente avena, y una predisposición genética asociada a genes localizados en la región HLA-DQ del cromosoma 6. Afecta a un 1% de la población mundial aunque se estima que sólo 1 de cada 8 casos está correctamente diagnosticado. Debido a la elevada cantidad de residuos de prolina y glutamina que contienen, las proteínas de gluten ofrecen cierta dificultad de hidrólisis durante la digestión en el tracto gastrointestinal en la población en general. ¿Pero por qué no tienen un efecto nocivo en todos los individuos? Solamente un 5% de los individuos genéticamente predispuestos desarrolla la enfermedad, lo que sugiere una fuerte implicación no solo de factores genéticos no HLA, sino de otros factores ambientales y posibles cambios en la barrera intestinal que contribuyan al desarrollo de una respuesta inflamatoria.

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se describió, en muestras de biopsias duodenales, un patrón de degradación de la gliadina compuesto por 7 proteasas duodenales específicas del intestino de los pacientes celíacos [208]. Estas proteasas duodenales, fueron incapaces de degradar las prolaminas de cereales no tóxicos para los pacientes celíacos, como arroz y maíz. Parece existir una relación directa entre la actividad degradadora de prolaminas de estas proteasas y la toxicidad del cereal que se utiliza como sustrato, por lo que consideramos muy interesante realizar estos mismos experimentos con la prolamina de avena (avenina), debido a la controversia que existe en cuanto a su toxicidad en los pacientes celíacos [209].

El análisis de una de las bandas de degradación del patrón descrito con la gliadina, se identificó un péptido (péptido 8-mer) cuyos puntos de corte eran de origen biológico, pero no humano [210]. El origen de la actividad degradadora de prolaminas característica de la EC es aún desconocido. Una de las teorías predominantes es la posible implicación bacteriana [100], debido a la existencia de diversos estudios que describen diferencias tanto cualitativas como cuantitativas en la composición de la flora bacteriana entre individuos control y pacientes celíacos. Dado que en las muestras de

tejido duodenal de los pacientes celíacos existen enzimas capaces de degradar la gliadina de una forma específica, creemos que el estudio de esta actividad en otros puntos de la mucosa duodenal de estos pacientes podría aportar información en cuanto a la localización física de estas enzimas en el duodeno de los pacientes celíacos. Por esta razón, decidimos estudiar la capacidad de degradación de la gliadina por proteasas presentes en muestras de jugo duodenal (secreción) y de cepillado duodenal (raspado de la capa de mucus) y compararlo con el patrón descrito en biopsias duodenales (tejido) con el objetivo de identificar la fuente de la actividad enzimática.

El péptido 8-mer se identificó como producto de la degradación de la ω -gliadina, y consideramos muy importante realizar estudios *in silico* para confirmar: i) si el péptido 8-mer se encuentra en otras proteínas de gluten de los cereales tóxicos para los pacientes celíacos, y ii) si el péptido 8-mer comparte parte de su secuencia con otros péptidos inmunogénicos o con alguno de los epítomos de gluten que se conocen hasta el momento.

Por otro lado, se han publicado numerosos estudios que demuestran como las células Caco-2, en presencia de gliadina, secretan al medio extracelular zonulina, la cual se une a su receptor en la superficie celular desencadenando una reorganización del citoesqueleto y una pérdida de la interacción ZO-1-occludina, cuya consecuencia final es el aumento de la permeabilidad del epitelio. Nos preguntamos si el péptido 8-mer tiene un efecto sobre el epitelio comparable al descrito con la gliadina y sus péptidos derivados. Además, existe la posibilidad de que el jugo duodenal o la capa de mucus que recubre el epitelio intestinal tengan una composición diferente en los pacientes celíacos de manera que predispongan a las células del epitelio intestinal al daño provocado por los péptidos tóxicos derivados del gluten.

Un mejor conocimiento de las bases celulares y moleculares de la interacción entre las prolaminas de los cereales y el epitelio intestinal permitiría identificar nuevas posibles dianas terapéuticas y el diseño de estrategias complementarias a la dieta sin gluten.

El péptido 8-mer fue identificado como resultado de la degradación de la gliadina incluida en un gel de acrilamida, por parte de proteasas duodenales específicas

de los pacientes celíacos. Quisimos comprobar la formación *in vivo* del péptido, mediante la búsqueda de anticuerpos IgA anti-8mer en el plasma de pacientes celíacos.

Además, si este péptido formara parte de las prolaminas de los cereales tóxicos para los celíacos, compartiendo un fragmento de su secuencia con los epítomos conocidos de gluten, y si además fuera capaz de alterar las uniones intercelulares y la expresión molecular de las células epiteliales del intestino de los pacientes celíacos, es probable que este péptido tenga propiedades inmunogénicas.

La detección en sangre de los pacientes celíacos de anticuerpos IgA específicos frente al péptido 8mer, confirmaría la capacidad del péptido de generar una respuesta inmune humoral o, lo que es lo mismo, su capacidad inmunogénica. Por otro lado, el diseño y desarrollo de un test ELISA que permitiera la detección de anticuerpos IgA específicos frente al péptido 8mer en muestras de sangre de pacientes celíacos, podría ser útil tanto en el diagnóstico como en el seguimiento de la enfermedad, y en el control de la correcta adherencia de los pacientes a la dieta sin gluten.

Capítulo III

Objetivos

3.1 Objetivos

Objetivo 1: Estudiar la actividad degradadora de prolaminas en el duodeno de pacientes celíacos y de individuos control no celíacos.

1.1 Estudiar mediante zimografía la capacidad de degradación de prolaminas de dos variedades de avena (aveninas) por proteasas presentes en explantes duodenales de pacientes celíacos e individuos control no celíacos.

1.2 Estudiar mediante zimografía la capacidad de degradación de gliadina por proteasas presentes en muestras de jugo duodenal y cepillado duodenal de pacientes celíacos e individuos control no celíacos. Comparar el patrón de degradación obtenido con el descrito anteriormente en explantes duodenales.

1.3 Analizar uno de los péptidos generados tras la degradación de la gliadina por dos de las proteasas que componen el patrón específico de la enfermedad celíaca (péptido 8-mer) descrito anteriormente.

Objetivo 2: Estudiar en un modelo *in vitro* de células epiteliales de intestino el efecto del péptido 8-mer y de las muestras de jugo y cepillado duodenal de pacientes celíacos.

2.1 Estudiar mediante inmunofluorescencia cambios estructurales en las proteínas de las uniones estrechas tras estimular las células Caco-2 con muestras de jugo duodenal de pacientes celíacos e individuos control.

2.2 Analizar los niveles de expresión de IL-15, TGF- β , MICA, Ocludina y ZO-1 en células Caco-2 estimuladas con muestras de jugo y cepillado duodenal de pacientes celíacos e individuos control.

2.3 Analizar los niveles de expresión de IL-15, TGF- β , MICA, Ocludina y ZO-1 en un modelo de células Caco-2 estimuladas con el péptido 8-mer antes y después de incubar las células con las muestras de jugo y cepillado duodenal.

Objetivo 3: Búsqueda mediante un ensayo ELISA de anticuerpos IgA frente al péptido 8-mer derivado de la α -gliadina.

3.1 Diseñar y estandarizar un ensayo ELISA que permita estudiar en muestras de plasma la presencia de anticuerpos IgA que reconozcan de forma específica el péptido 8-mer en estado nativo y desaminado.

3.2 Estudiar la presencia de anticuerpos IgA anti-8mer en muestras de plasma de pacientes celíacos (tanto en actividad como en dieta sin gluten), de pacientes no celíacos y de individuos sanos.

3.3 Estudiar la presencia de anticuerpos IgA anti-8mer en muestras de plasma de pacientes con otras enfermedades crónicas del intestino (Colitis Ulcerosa y Enfermedad de Crohn).

3.4 Ajustar el protocolo optimizado del ensayo ELISA IgA anti-8mer para estudiar la presencia de estos anticuerpos en muestras de jugo duodenal de pacientes celíacos (tanto en actividad como en dieta sin gluten) y de pacientes no celíacos.

Capítulo IV

Sujetos de estudio y muestras

Los ensayos que se presentan en esta tesis doctoral se realizaron utilizando diferentes tipos de muestras biológicas cuyas características se detallan a continuación, junto con la procedencia de las mismas, las características de los pacientes y los criterios de inclusión (**Tabla 8**) de los mismos en los diferentes grupos de estudio. Tanto la clasificación como las abreviaturas que se presentan se respetarán a lo largo de todo el trabajo.

4.1 Pacientes

A) Pacientes celíacos en actividad (aEC): pacientes celíacos al diagnóstico, con síntomas compatibles con la enfermedad, serología positiva (anticuerpos IgA anti-endomisio y/o anti-transglutaminasa), genética positiva (HLA-DQ2/DQ8), alteraciones histológicas en la mucosa intestinal y con una dieta normal.

B) Pacientes celíacos en dieta sin gluten (DSG): pacientes celíacos que ya siguen una dieta libre de gluten y por lo tanto presentan una recuperación de la lesión histológica (Marsh 0-1), además de serología negativa desde al menos un año en DSG.

C) Pacientes control no celíacos (PGI): pacientes no celíacos pero que presentan otra patología gastrointestinal y síntomas compatibles con la EC aunque finalmente no cumplan con los criterios diagnósticos de la EC. Las características de estos pacientes son más variables que los anteriores.

D) Pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII): Este grupo incluye pacientes con Colitis Ulcerosa (C.U), con diarrea, rectorragia, afectación rectal constante y afectación colónica más o menos extensa; y pacientes con Enfermedad de Crohn (E.Crohn) caracterizada por diarrea, dolor abdominal, afectación en íleon, íleon y colon o únicamente colon.

E) Individuos sanos (SANOS): Adultos voluntarios sanos y niños sin patologías gastrointestinales.

Paciente	N total (a lo largo de la Tesis)	Genética	Serología	Grado de atrofia intestinal	Dieta
aEC	78	+	+	Marsh 2-3	DCG
DSG	54	+	+/-	Marsh 0-2	DSG
PGI	87	+/-	-	Marsh 0-3	DCG
EII	77	+/-	+/-	Desconocido	DCG
SANO	37	+/-	-	No determinado	DCG

Tabla 8: Abreviaturas y criterios de inclusión de los distintos grupos de pacientes utilizados a lo largo de esta tesis. A lo largo de esta tesis doctoral se han utilizado diferentes muestras humanas procedentes de un total de 333 pacientes agrupados en: pacientes celíacos en actividad (aEC), pacientes celíacos en dieta sin gluten (DSG), pacientes no celíacos con otra patología gastrointestinal (PGI), pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII) e individuos control sanos (SANOS). N total: número total de pacientes incluidos a lo largo de toda la tesis, independientemente del tipo de muestra tomada.

4.2 Muestras

Se emplearon cuatro tipos de muestras biológicas todas ellas con previo consentimiento informado del paciente y de los padres o tutores legales en el caso de pacientes en edad pediátrica.

A) Biopsia duodenal: muestras de tejido de duodeno y yeyuno, recogidas de acuerdo al procedimiento utilizado normalmente para intervenciones con fines diagnósticos o terapéuticos, y siguiendo protocolos aprobados por la Comisión de Ética e Investigación del centro correspondiente. Las muestras se obtuvieron en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid: Servicio de Aparato Digestivo (Dr. Luis Fernández Salazar y Dr. Benito Velayos) y Servicio de Pediatría (Dra. Carmen Calvo y Dr. J. Manuel Marugán) y en el Complejo Hospitalario Reina Sofía de León: Servicio de Aparato Digestivo (Dr. Santiago Vivas).

Para la obtención del explante se utilizó la cápsula de *Watson (Ferias Medical Lt, Reino Unido)* en duodeno distal y yeyuno en niños de corta edad, y pinzas de biopsia en el transcurso de una gastroduodenoscopia (duodeno proximal y distal) en el caso de niños de mayor edad y en adultos.

Para la realización de estudios celulares o enzimáticos, la muestra fue conservada en suero fisiológico durante un máximo de 2 horas, hasta su procesamiento. En el caso de ser utilizada para estudios moleculares, la muestra fue conservada en *RNA later* a -20°C hasta su procesamiento.

B) Aspirado duodenal: Muestra de jugo duodenal que se obtiene mediante aspiración directa durante una gastroscopia. Las muestras fueron recogidas en el Servicio de Aparato Digestivo (Dr. Santiago Vivas) del Complejo Hospitalario Reina Sofía de León. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su utilización.

C) Cepillado duodenal: Muestra de la mucosa que recubre la pared del intestino obtenida durante la gastroscopia mediante el raspado de la zona a biopsiar con un cepillo. Las muestras fueron recogidas en el Servicio de Aparato Digestivo (Dr. Santiago Vivas) del Complejo Hospitalario Reina Sofía de León. Inmediatamente después del raspado, el cepillo es introducido en un tubo *ependorf* con *RNA later* y conservado a -20°C hasta su utilización.

D) Muestra de plasma sanguíneo: Las muestras de plasma incluidas en este trabajo fueron obtenidas de los Servicios de Aparato Digestivo y de Pediatría del Hospital Clínico Universitario y del Hospital Río Hortega de Valladolid. Se obtuvieron a partir de sangre total tratada con EDTA, y fueron conservadas a -20°C hasta su utilización.

Se realizó una recogida anónima y codificada de los datos de cada paciente. Los protocolos de estudio fueron aprobados por la Comisión de Ética del Complejo Hospitalario Reina Sofía de León, del Hospital Clínico Universitario de Valladolid y de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid. El número y características de las muestras utilizadas en cada ensayo se detalla en la metodología correspondiente al abordaje de cada uno de los objetivos planteados.

Capítulo V

Actividad degradadora de prolaminas específica de la mucosa duodenal de los pacientes celíacos

5.1 Antecedentes

En unos estudios realizados por nuestro grupo en el año 2008 [211] se describió un patrón de 7 proteasas duodenales degradadoras de gliadina y específicas de los pacientes celíacos, que fue publicado posteriormente [208] en un trabajo en el que se describían estudios de zimografía con gliadina para estudiar extractos proteicos obtenidos de biopsias duodenales de pacientes celíacos en actividad, pacientes celíacos en dieta sin gluten y pacientes control no celíacos. Dicho patrón se componía de 7 proteasas con pesos moleculares aproximados de 92, 82, 35, 33, 26, 24 y 20 kDa, que se encontraron en casi todas las muestras de pacientes EC, independientemente del estado de la mucosa y del tratamiento, pero que estaban ausentes en las muestras de pacientes control no celíacos.

Con el objetivo de identificar los péptidos de gliadina generados de forma específica durante la degradación de la gliadina por las proteasas descritas en el patrón, la banda de degradación más intensa (26 kDa) procedente de un paciente en DSG fue sometida a un análisis por espectrometría de masas de trampa iónica. Se identificaron 3 péptidos: 8-, 15- y 18-mer [211].

Péptido	Prolamina	Alineamiento de secuencias
8-mer	ω-gliadina	FPLQPQQP -S.FPLQPQQP.F-
15-mer	γ-gliadina	PFIQPSLQQQLNPCK -P.PFIQPSLQQQLNPCK.N-
18-mer	LMW-glutenina	VFLQQQCSPVAMPQSLAR -K.VFLQQQCSPVAMPQSLAR.S-

Tabla 9: Péptidos identificados mediante el análisis por espectrometría de masas de trampa iónica de la banda de degradación de gliadina de 26kDa: 8-mer, 15-mer y 18-mer y sus alineamientos de secuencia con las proteínas ω - y γ -gliadina y LMW-glutenina de las que proceden. En negrita se marcan los puntos de corte que no pueden haber sido generados por la tripsina durante el proceso de análisis y por lo tanto fueron generadas por la actividad de proteasas biológicas.

Para determinar la naturaleza de los puntos de corte de los tres péptidos se realizó una búsqueda en la base de datos de peptidasas MEROPS. Como se muestra en

la **Tabla 9**, el extremo C-terminal del péptido 15-mer y ambos extremos del péptido 18-mer se identificaron como dianas potenciales para la tripsina lo que significaba que podrían haber sido generados durante la digestión de la tripsina aplicada en el análisis por MALDI-TOF. Sin embargo, el extremo N-terminal del péptido 15-mer y ambos extremos del péptido 8-mer no mostraron coincidencia ninguna con los puntos de corte de la tripsina y por lo tanto fueron generados por la actividad de las proteasas duodenales.

Además, se realizó un segundo análisis de la banda de degradación de 82kDa obtenida de un paciente celiaco en actividad (**Figura 9**), lo que reveló de nuevo la generación del péptido 8-mer como resultado de la digestión de la gliadina. La identificación del péptido 8-mer en ambas bandas de degradación confirmó que provenía de la degradación de la gliadina por las proteasas duodenales específicas de la mucosa duodenal de los pacientes celiacos.

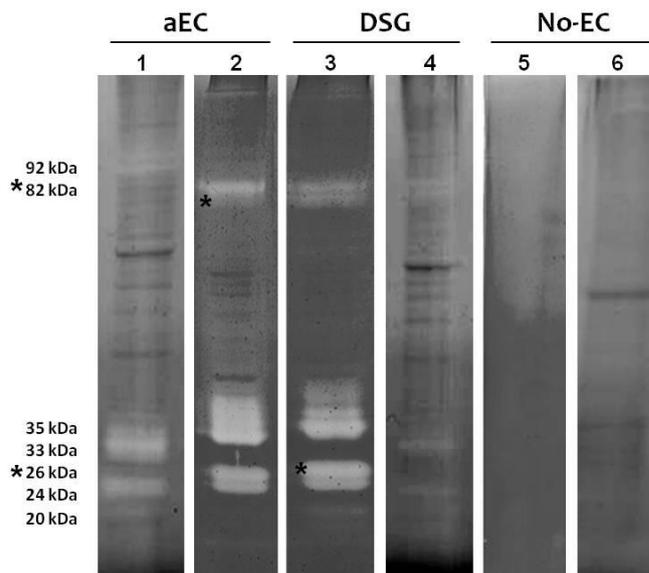


Figura 9: Zimograma de gliadina con extractos proteicos de biopsias intestinales de pacientes celiacos en actividad (aEC, líneas 1 y 2), pacientes celiacos en dieta sin gluten (DSG, líneas 3 y 4) y pacientes control no celiacos (No-EC, líneas 5 y 6). El patrón de degradación de gliadina, caracterizado por 7 proteasas duodenales específicas de los pacientes celiacos (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.

En un trabajo publicado en *Gut* [6], Comino y colaboradores estudiaron la toxicidad de 9 variedades de avena. Mediante espectrometría de masas de trampa iónica analizaron las diferentes fracciones de prolaminas de cada una de estas variedades. El espectro de las fracciones de avenina obtenidas mediante MALDI-TOF y la distribución electroforética de las prolaminas en SDS-PAGE revelaron una gran variabilidad en la composición de prolaminas entre los diferentes cultivares. Para estudiar la posible toxicidad de las diferentes avenas, utilizaron el anticuerpo monoclonal G12 (moAb G12), que reconoce de forma específica el péptido inmunogénico 33-mer [207]. Las avenas estudiadas mediante ELISA, presentaban diferente grado de afinidad por el anticuerpo G12, lo que les permitió agruparlas en 3 categorías: avenas con alta afinidad por el anticuerpo G12, avenas con afinidad intermedia y avenas que no eran reconocidas por el moAb G12.

Con el objetivo de estudiar una posible relación entre el grado de toxicidad de las diferentes variedades de avena y la capacidad de las proteasas duodenales de los pacientes celíacos de degradar las prolaminas de estas avenas, se seleccionaron dos variedades representativas de los dos extremos en cuanto al grado de toxicidad: la avena OA729, clasificada como una variedad con alta afinidad por el anticuerpo G12, y la avena OR721 incluida en el grupo de variedades de avena que no son reconocidas por el moAbG12.

5.2 Objetivos concretos

1. Estudiar mediante zimografía la capacidad de degradación de prolaminas de dos variedades de avena (aveninas) por proteasas presentes en explantes duodenales de pacientes celíacos e individuos control no celíacos.
2. Estudiar mediante zimografía la capacidad de degradación de gliadina por proteasas presentes en muestras de jugo duodenal y cepillado duodenal de pacientes celíacos e individuos control no celíacos. Comparar el patrón de degradación obtenido con el descrito anteriormente en explantes duodenales.
3. Analizar uno de los péptidos generados tras la degradación de la gliadina por dos de las proteasas que componen el patrón específico de la enfermedad celíaca (péptido 8-mer) descrito anteriormente.

5.3 Material y métodos

● Materiales

1. Trizol®, Tri Reagent (Applied Biosystems, Life Technologies, USA)
2. SDS (Sodium dodecyl sulfate, SDS solution 10% (w/v), Bio-Rad Laboratories, USA)
3. Isopropanol (2-Propanol, Panreac Quimica Sau, España)
4. Etanol (Ethanol 96% vol, VWR Prolabo Chemicals, Francia)
5. DC™ Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, USA)
6. Albumin bovine serum fraction V (Sigma-Aldrich, Alemania)
7. Tampón fosfato salino (PBS without Phenol red, without Ca²⁺ without Mg²⁺ (Lonza, Cambrex Iberia, España)
8. RNALater® solution (Ambion Inc, USA)
9. Agua estéril libre de nucleasas (ThermoFisher Scientific, España)
10. NanoDrop® (ThermoFisher Scientific, España)
11. Lector de placas Tecan Sunrise (Tecan, Austria)
12. Azul de bromofenol (Electrophoresis Purity Reagent Bromophenol Blue, Bio-Rad Laboratories, USA)
13. Glicerol (Glycerol 99% PS, Panreac Quimica Sau, España)
14. Glicina (Glycine, Bio-Rad Laboratories, USA)
15. Tris (Tris (hydroxymethyl) aminomethan, ACS Reagenz, Sigma-Aldrich, Alemania)
16. Coomassie blue (Brilliant Blue G, Sigma-Aldrich, Alemania)
17. Ácido acético (Acetic acid 96%, Panreac Quimica Sau, España)
18. Metanol (Triclorometano estabilizado con etanol, Panreac Quimica Sau, España)
19. Tritón X-100 (Bio-Rad Laboratories, USA)
20. GelAir Dryer (Bio-Rad Laboratories, USA)
21. Acrilamida/Bis-acrilamida (40% Acrylamide/bis Solution, 37.5:1 (2.6% C), Bio-Rad Laboratories, USA)
22. APS (Ammonium Persulfate, Bio-Rad Laboratories, USA)
23. Temed (Bio-Rad Laboratories, USA)

24. Gliadin from wheat (Sigma-Aldrich, Alemania)
25. Embudo Büchner

● Métodos

1. Extracción de las proteínas y ARN

La extracción de ARN y proteínas tanto de muestras biológicas como de la línea celular se realizó mediante el método del *Trizol* [212] según las indicaciones del fabricante: la muestra a extraer se recogió en 400ml de Trizol, donde se homogeneizó. A continuación se enrasó con trizol hasta 1ml y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Tras añadir 200µl de cloroformo, se agitó fuerte durante 15 segundos, se dejó reposar durante 3 minutos y se centrifugó (12000g, T= 4°C, t= 15 min) de manera que se obtuvieron dos fases: la inferior orgánica conteniendo el DNA y las proteínas, y la superior acuosa con el ARN.

La fase de ARN se transfirió a otro tubo libre de RNasas, se agregaron 500µl de isopropanol, se agitó, se dejó reposar a temperatura ambiente 10 min y se centrifugó (12000g, T= 4°C, t= 5 min). El precipitado se lavó dos veces con 1ml de EtOH (etanol) 75%, se vorteoó durante 30 segundos y se centrifugó (7500g, T= 4°C, t= 5 min). El precipitado (ARN) se secó durante 10 min en la campana de flujo y se disolvió en 15-20µl de agua estéril libre de nucleasas (repipeteando varias veces e incubando a T= 55°C, t= 10 min). El ARN fue conservado a -20°C hasta su uso.

Para la purificación de las proteínas, tras retirar la fase de ARN, se agregó 1ml de isopropanol, se agitó fuerte y se centrifugó (12000g, T= 4°C, T= 10 min). El precipitado se lavó 3 veces con 1.5ml de Guanidina HCl 0.3M, se dejó reposar 15 min a temperatura ambiente y se centrifugó (7500g, T= 4°C, t= 5 min). Tras agregar 1.5ml de EtOH 70%, se dejó reposar 20 min a temperatura ambiente y se centrifugó (7500g, T= 4°C, t= 5 min). El precipitado (proteínas) se secó a 37°C durante 1h y se resuspendió en 300µl de SDS 1% (en agitación y a 50°C). Las proteínas se conservaron a -20°C hasta su uso.

2. Cuantificación de ARN

La calidad y cantidad de ARN obtenido se midió con el NanoDrop® siguiendo las instrucciones del fabricante, empleando 1µl de ARN de cada muestra.

3. Cuantificación de proteínas

Las proteínas extraídas se cuantificaron utilizando el *DC Protein Assay*, un kit basado en el método colorimétrico de *Bradford* [213]. Este método requiere la preparación de una curva de calibrado empleando una proteína patrón como puede ser la seroalbúmina bovina (*Albumin bovine serum fraction*), diluida en SDS 1%. La lectura de la placa se realizó utilizando el lector Tecan Sunrise.

4. Zimografía

La zimografía es una técnica electroforética que permite la visualización del número y el tamaño aproximado de las proteasas presentes en una muestra en función de su capacidad de degradación de una proteína sustrato, agregada en el gel de poli(acrilamida) [214-215]. A diferencia de las electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), en la zimografía se utilizan condiciones suaves, sin agentes reductores, para evitar la pérdida de actividad enzimática de las proteínas a estudiar. El gel de acrilamida se compone de dos soluciones: gel concentrador (parte superior) y gel separador (parte inferior) el cual lleva incluida la proteína (0.1% v/v), que queda inmovilizada de forma homogénea entre los polímeros de acrilamida/bis-acrilamida, y por tanto no sujeta a la electroforesis.

Para preparar el gel (**Tabla 9**), se cargaron aproximadamente 4ml del gel separador y se rellenó el espacio con butanol. Una vez gelificado, se lavó con H₂O destilada, se colocó el peine y se rellenó el espacio con el gel concentrador. Tras 30-40 minutos de reposo el gel polimerizó y se retiró el peine. A continuación se cargaron las muestras de estudio junto con el *buffer* de carga (azul de bromofenol en glicerol y agua) en un volumen final de 20µl.

Se colocó el gel en la cubeta de electroforesis y se cubrió con el *Running buffer* 1x (Stock 5x: 144g glicina, 30g Tris y 5g SDS en 1 litro de agua destilada). El gel concentrador se dejó correr durante 15 min a 50V y 400mA y después el gel separador durante 2h a 100V y 400mA. Tras la electroforesis, los geles se lavaron durante 30 min

con H₂O destilada al 2% de Tritón X100 para retirar el SDS de las proteínas. Después se incubaron durante 18h a 37°C en el siguiente buffer: 5mM CaCl₂, 50mM Tris y pH 7.5, el cual ofrece las condiciones necesarias para que las proteasas presentes en la muestra degraden la gliadina. Finalmente, se tiñó el gel con azul de *Coomasie* (0,1% de *Brilliant Blue G*, diluido en una mezcla de acético: metanol: agua (1:3:6), y se lavó posteriormente con la mezcla decolorante (acético: metanol: agua (1:3:6), de manera que las bandas de degradación se revelaron como lugares con ausencia de tinción, frente al resto de la matriz que al llevar incluida la proteína sustrato se mantuvo de color azul. La mejor forma de conservar los geles es secarlos en un *GelAir Dryer*, de esta forma se mantiene la integridad del mismo y la intensidad del colorante que permite distinguir con claridad las bandas de degradación.

Componente	Gel Separador	Gel Concentrador
Acrilamida/Bis-acrilamida 40%	2250 µl	250 µl
Tris 1.5M pH 8.8	990 µl	0 µl
Tris 1M pH 6.8	0 µl	250 µl
SDS 10%	39,6 µl	20 µl
Agua destilada	2495 µl	1460 µl
Sustrato proteico	200 µl	0 µl
APS 0.1%	26,4 µl	20 µl
Temed	2,64 µl	4 µl
Total	6 ml	2 ml

Tabla 9: Componentes del gel de acrilamida de un zimograma.

5. Obtención de prolaminas

Como sustrato de los zimogramas se utilizaron dos tipos de prolaminas: i) gliadina comercial de trigo (*Gliadin from wheat*), resuspendida en EtOH 70% a una concentración de 100mg/ml, y ii) aveninas extraídas a partir de harina procedente de 2 variedades españolas y comerciales de avena (*Avena sativa* L.) acceso OR721 y OA729, proporcionadas por el grupo de investigación de la Dra Carolina Sousa, de la Universidad de Sevilla [6].

El protocolo utilizado para los estudios de degradación de gliadina fue el

detallado en el apartado anterior, sin embargo para la inclusión en el gel de las prolaminas de avena fue necesario optimizar su extracción para lo que se probaron 3 métodos diferentes:

Extracción en EtOH 70%: se diluyó la harina en EtOH 70% a una concentración de 200mg/ml y se agitó durante 24h a 28°C. Con ayuda de un embudo Büchner se filtró la solución de harina en etanol y se eliminó el precipitado. El filtrado se neutralizó a pH 7 con amonía 6M y se añadió EtOH absoluto hasta llegar a EtOH 93%. Se dejó en reposo y tapado a 4°C durante 16h. Finalmente se centrifugó a 8000rpm durante 10 min y se secó el precipitado a 37°C durante 1h. El sólido resultante (prolamina) se resuspendió en EtOH 70%.

Extracción con Trizol: Se homogeneizaron 20mg de harina en 500 µl de trizol, se agregaron 500 µl de EtOH absoluto a -20°C y se agitó durante 30 minutos a 4°C. Se centrifugó a 12000rpm, 4°C y 15min. El precipitado se lavó con EtOH 70% a -20°C (agitando durante 20min a 4°C y centrifugando a 12000rpm, 4°C y 5min). Se secó el precipitado a 37°C y se resuspendió en 300µl de SDS 1%. Las proteínas fueron cuantificadas por el método Bradford.

Extracción en EtOH 55%: Se preparó una solución de EtOH 55% saturada de harina. Se dejó reposar unos minutos y se centrifugó a 10000rpm durante 10 minutos. El precipitado se secó a 37°C y se resuspendió en SDS1%. Las proteínas fueron cuantificadas por el método Bradford.

6. Análisis de secuencias

La identificación de las proteínas se llevó a cabo mediante la búsqueda en la base de datos NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) utilizando el programa BLASTP algorithm v.2.2.20. El análisis de los puntos de corte de los péptidos identificados se realizó con la base de datos de peptidasas Merops (v.9.8) .

5.4 Resultados

5.4.1 Las proteasas presentes en los explantes duodenales de los pacientes celíacos son capaces de degradar las prolaminas de una variedad de avena.

Para el estudio de la actividad degradadora de prolaminas de avena por proteasas presentes en muestras de biopsia duodenal, se emplearon un total de 6 biopsias duodenales procedentes de 3 pacientes aEC y de 3 pacientes control PGI.

En primer lugar se hicieron varios estudios de zimografía incluyendo en el gel de acrilamida 500µl del extracto de prolaminas de las 2 harinas de avena extraídas en EtOH 70%. En el gel se cargaron 8µg/pocillo de proteína total obtenidos de cada una de las muestras de biopsia duodenal. Como control positivo de la técnica, se cargaron 8µg de extracto proteico obtenido de una muestra de intestino delgado de obeso mórbido tratada con colagenasa [216]. En la **Figura 10** se muestran dos geles representativos de varios ensayos.

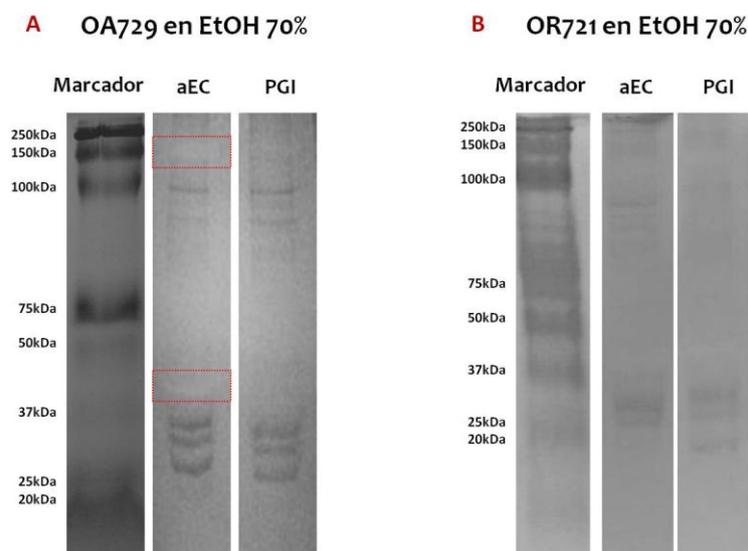


Figura 10: Zimograma de aveninas, extraídas en EtOH 70%, de las avenas OA729 (A) y OR721 (B) representativos de varios experimentos independientes utilizando el extracto proteico duodenal de 3 pacientes celíacos en actividad (aEC) y de 3 pacientes control no celíacos (PGI). A la izquierda se observa el marcador de peso molecular (kDa) utilizado en ese experimento. En el gel A (prolaminas de la harina OA729) se observaron dos bandas de degradación en las muestras de los pacientes aEC (encuadradas en rojo) de aproximadamente 100 y 40 kDa, mientras que en los pacientes PGI no parecía que hubiera habido degradación de la avenina. Sin embargo, en el gel B (prolaminas de la harina OR721), no se detectaron bandas de degradación en ninguno de los dos grupos de pacientes.

Las proteasas extraídas de ambos grupos de pacientes (aEC y PGI) parecían no ser capaces de degradar las prolaminas de la variedad OR721 de avena, ya que no se detectó ninguna banda. Sin embargo, aunque de forma muy tenue, en el caso de la avena OA729, se detectaron 2 bandas de degradación en el extracto proteico duodenal de los pacientes aEC, mientras que no se observó ninguna actividad en las muestras de los pacientes PGI. Las bandas de degradación observadas eran mucho más suaves que las descritas anteriormente en el patrón de degradación de gliadina [208]. Una posible explicación es la diferencia en el contenido de prolaminas con respecto a las proteínas totales en trigo y avena (69% y 16% respectivamente). Por esta razón, se aumentó a 800µl el volumen de extracto de prolamina incluido en el gel, pero no polimerizaba. Con el objetivo de conseguir una mayor fracción de prolaminas de avena en el menor volumen de alcohol posible se procedió a realizar la extracción de las prolaminas de la avena OA729 en Trizol, cuyos resultados se muestran en la **Figura 11**.

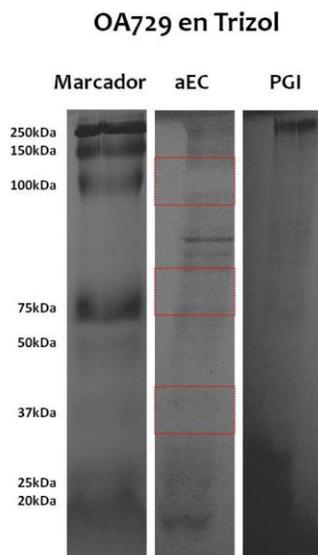


Figura 11: Zimograma de avenina, extraída en Trizol, de la avena **OA729** representativo de varios experimentos independientes utilizando el extracto proteico duodenal de 3 pacientes celíacos en actividad (aEC) y de 3 pacientes control no celíacos (PGI). A la izquierda se observa el marcador de pesos moleculares (kDa) utilizado en ese experimento. Se observaron tres bandas de degradación en las muestras de los pacientes aEC (encuadradas en rojo) de aproximadamente 100, 80 y 40 kDa, mientras que en los pacientes PGI no parecía que hubiera habido degradación de la avenina.

Se consiguió una polimerización mucho más rápida del gel, así como una distribución homogénea de la prolamina en el gel. A pesar de observar 3 bandas de degradación de aproximadamente 100, 80 y 40 kDa solamente en la muestra de los pacientes celíacos, el hecho de que este protocolo conllevara tantos lavados con etanol nos hizo pensar que quizás estábamos perdiendo una importante cantidad de prolaminas

durante el proceso de extracción. Por ello se cuantificó mediante Bradford la cantidad de proteínas presentes en el extracto de prolaminas, obteniendo una concentración de 1,13 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Finalmente se realizó una última extracción de prolaminas, esta vez en EtOH 55% con el objetivo de aumentar la concentración de proteínas obtenidas en el precipitado final.

Como se observa en la **Figura 12**, una vez más, solamente las enzimas presentes en las muestras de los pacientes celíacos eran capaces de degradar la avenina, y esta vez con mayor intensidad que en los ensayos anteriores. Además, la cuantificación mediante Bradford dio como resultado una concentración de 2,32 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteínas en el precipitado final, más del doble que la obtenida con el trizol.

Aunque la distribución de las prolaminas en el gel era menos homogénea que con los protocolos anteriores, seleccionamos el EtOH 55% como el mejor solvente para extraer las prolaminas de la harina de avena ya que las bandas de degradación eran más nítidas e intensas.

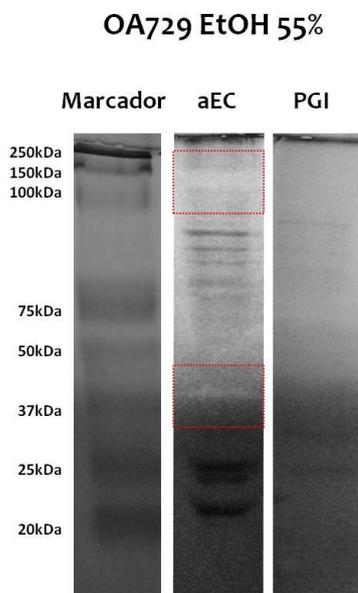


Figura 12: Zimograma de avenina, extraída en EtOH 55%, de la avena OA729 representativo de varios experimentos independientes utilizando el extracto proteico duodenal de 3 pacientes celíacos en actividad (aEC) y de 3 pacientes control no celíacos (PGI). A la izquierda se observa el marcador de pesos moleculares (kDa) utilizado en ese experimento. Se observaron tres bandas de degradación en las muestras de los pacientes aEC (encuadradas en rojo) de aproximadamente 100, 80 y 40 kDa, mientras que en los pacientes PGI no parecía que hubiera habido degradación de la avenina.

De las dos variedades de avena estudiadas, solamente se observó actividad degradadora cuando las prolaminas incluidas en el gel de acrilamida procedían de la avena OA729, mientras que en el caso de la avena OR721, no se detectó ningún tipo de

degradación. Además, esta actividad detectada era específica de los pacientes celíacos, ya que los extractos proteicos procedentes de pacientes control no celíacos no mostraron ningún tipo de bandas de degradación.

La avena OA729, cuyas prolaminas son degradadas de forma específica por las proteasas duodenales de los pacientes celíacos, fue identificada por Comino et al [6] como una de las avenas que presentaba un elevado grado de afinidad por el anticuerpo G12. Por el contrario, la variedad OR721 identificada [6] como una avena no reconocida por el anticuerpo G12, no mostró ningún tipo de degradación por proteasas duodenales de pacientes celíacos ni de pacientes control no celíacos.

Hemos observado como en las muestras de tejido duodenal de los pacientes celíacos existen enzimas específicas que son capaces de degradar las prolaminas de una variedad de avena que, además, contiene fracciones o péptidos tóxicos que son reconocidos por el anticuerpo monoclonal G12. Estos resultados sugieren la existencia de una relación directa entre el grado de toxicidad de las prolaminas de avena incluidas en el gel de acrilamida, y su degradación por parte de las proteasas duodenales específicas de los pacientes celíacos. Esta relación toxicidad-degradación es comparable a la observada con la gliadina de trigo, la cual resulta tóxica para los pacientes celíacos y además es degradada por proteasas duodenales específicas de los pacientes celíacos, mientras que la zeína de maíz, que no resulta tóxica para estos pacientes, no es degradada por las proteasas duodenales, ni en los pacientes celíacos ni en los pacientes controles no celíacos [210].

5.4.2 Detección de actividad degradadora de gliadina específica de los pacientes celíacos en muestras de jugo y cepillado duodenal.

Con el objetivo de conocer más acerca de la localización de las enzimas duodenales específicas de los pacientes celíacos capaces de degradar la gliadina, se estudió mediante zimografía la presencia de estas enzimas en muestras de jugo duodenal y cepillado duodenal de pacientes celíacos. La comparación de esta actividad enzimática en muestras de tejido duodenal (biopsia), jugo duodenal (aspirado) y capa de mucus (cepillado) podría permitirnos conocer si se trata de enzimas de la lámina propia, de enzimas expresadas en la capa de mucus o si son secretadas a la luz intestinal. Si estas enzimas fueran capaces de degradar la gliadina *in vivo*, podrían jugar un papel en la patogenia de la EC.

Se utilizó un total de 79 muestras duodenales (**Tabla 10**).

GRUPOS DE ESTUDIO		BIOPSIA DUODENAL	JUGO DUODENAL	CEPILLADO DUODENAL
Pacientes control no celíacos	PGI	10	6	2
Pacientes celíacos en actividad	aEC	11 + 1*	11 + 1*	8
Pacientes celíacos en dieta sin gluten	DSG	4**	11	6 + 4**
Total		26	29	20

Tabla 10: Clasificación de las muestras duodenales incluidas en el estudio mediante zimografía de la actividad degradadora de gliadina. Se utilizaron tres tipos de muestra duodenal (biopsia, jugo y cepillado) procedentes de tres tipos de pacientes: control no celíacos (PGI), celíacos en actividad (aEC) y celíacos en dieta sin gluten (DSG). En algunos casos, dos de los tres tipos de muestra fueron tomadas del mismo paciente: (*) muestra de jugo y biopsia duodenal tomadas al mismo tiempo de 1 paciente aEC, y (**) muestra de cepillado y biopsia duodenal tomadas al mismo tiempo de 4 pacientes DSG.

En los estudios de zimografía realizados con biopsias intestinales, las proteínas totales extraídas eran cuantificadas y de cada una de ellas se cargaban 8µg de proteínas totales.

A la hora de realizar los ensayos de zimografía con las muestras de jugo duodenal y cepillado duodenal, el principal problema con el que nos encontramos fue cómo normalizar la cantidad de proteínas totales que se cargan en el gel. Las muestras de jugo duodenal se recogen mediante aspiración directa durante la endoscopia. Son muestras muy diluidas (recogidas en PBS) y aunque el procedimiento llevado a cabo por el gastroenterólogo sea exactamente el mismo para todos los pacientes, la localización exacta de estas secreciones en el tracto duodenal es difícil de determinar, además de presentar una composición que varía enormemente de unos individuos a otros. Sin embargo, las muestras de mucus recogidas mediante el raspado con un cepillo de la zona a biopsiar, constituyen una muestra duodenal más concentrada, limpia y localizada. Las muestra de mucus se recibió adherida al cepillo con el que se había realizado el raspado de la capa de mucus previo a la toma de la biopsia intestinal.

Las muestras de jugo duodenal fueron las primeras con las que se comenzó a trabajar. Dado que el objetivo final era comparar los resultados de los zimogramas con los observados previamente en las biopsias intestinales, decidimos realizar la extracción de las proteínas totales de estas muestras utilizando el mismo protocolo empleado para su extracción en biopsias: método del trizol. Se realizó la extracción de 200µl del jugo duodenal, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (página 67). Las proteínas fueron cuantificadas mediante un Bradford, con el objetivo inicial de cargar la misma cantidad de proteínas totales que se utilizó con las biopsias (8µg/muestra). La cantidad de proteínas obtenidas mediante la extracción con trizol fue muy pequeña, de manera que para conseguir una cantidad de proteínas comparable a la obtenida con las biopsias, era necesario cargar un volumen de muestra demasiado grande. El tamaño de los pocillos del gel de acrilamida limita el volumen de muestra que se puede cargar a 20 µl aproximadamente, por lo decidimos cargar el máximo volumen de extracto proteico en SDS al 1% (16µl) junto con el buffer de carga (4µl). Se realizaron varias pruebas con muestras de jugo duodenal de pacientes aEC, DSG y PGI (resultados no mostrados). Se observó actividad degradadora en las muestras de los pacientes celíacos, pero en lugar de bandas de degradación, la actividad enzimática se reveló como rastros muy difuminados. Consideramos que la falta de degradación podría ser debida a la poca cantidad de proteínas obtenidas mediante la extracción, por lo que decidimos probar a cargar las muestras de jugo duodenal sin ningún tipo de tratamiento previo ni extracción

de proteínas. Se agregó el mismo volumen de muestra que en los ensayos anteriores (16µl), observándose un incremento importante tanto en la intensidad de la degradación como en el número de bandas identificadas.

Posteriormente se comenzó a trabajar con las muestras de cepillado duodenal. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con los aspirados, se decidió que la mejor forma de recuperar la muestra adherida al cepillo, con al menor contaminación de RNA later posible, era homogeneizar el cepillo en 200µl de PBS. De esta manera procedimos a trabajar con ambos tipos de muestra (jugo y mucus duodenal) diluidas en PBS y sin ningún tipo de tratamiento previo ni posible contaminación con los reactivos empleados durante los procesos de extracción proteica.

Para realizar los ensayos se utilizó el mismo volumen de cada una de las muestras, sin embargo, la cantidad de proteínas presente en ellas se desconocía. Por tanto, estos ensayos se realizaron como una primera aproximación en la comparación de la intensidad y número de bandas de la actividad degradadora de gliadina presentes en los tres tipos de muestra duodenal, siendo conscientes de que las diferencias observadas entre ellas podrían deberse a una diferencia en el contenido enzimático total.

En primer lugar se estudió la degradación en los diferentes tipos de muestra, tomadas de un total de 30 pacientes celíacos en actividad: 11 muestras de biopsia duodenal procedentes de 11 pacientes aEC, 11 muestras de jugo duodenal procedentes de 11 pacientes aEC y 8 muestras de cepillado duodenal procedentes de 8 pacientes aEC. En la **Figura 13** se muestran los resultados obtenidos en los tres tipos de muestra duodenal procedentes de 6 pacientes celíacos en actividad en representación del total de muestras estudiadas.

PACIENTES CELIACOS EN ACTIVIDAD

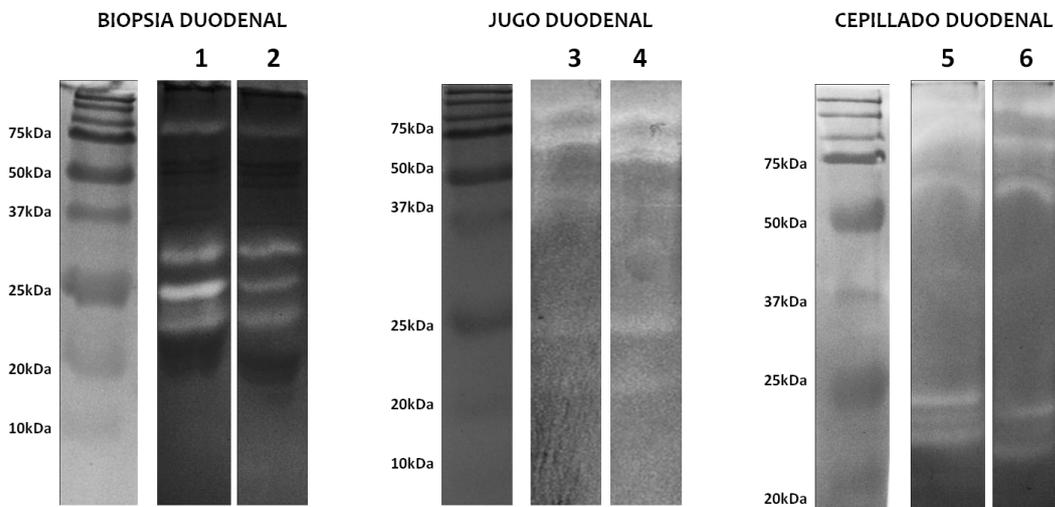


Figura 13: Zimograma de gliadina representativo de varios experimentos independientes utilizando tres tipos de muestra duodenal procedentes todas ellas de diferentes pacientes celíacos en actividad (aEC). Se estudió la capacidad degradadora de gliadina de extractos proteicos obtenidos de biopsias duodenales (líneas 1 y 2), de muestras de jugo duodenal (líneas 3 y 4) y de muestras de cepillado duodenal (líneas 5 y 6). Junto a cada tipo de muestra está el marcador de peso molecular utilizado en cada experimento. Las bandas de degradación se observan como ausencia de color. En todas las muestras se detectó degradación de la gliadina incluida en el gel.

Tanto en el jugo duodenal como en el cepillado duodenal procedente de estos pacientes se observaron bandas de degradación de la gliadina incluida en el gel de acrilamida. Las muestras de jugo presentaban 4 bandas bastante bien definidas, dos de ellas de entre 50 y 90 kDa, y las otras dos de entre 20 y 25 kDa aproximadamente. En las muestras de cepillado duodenal el número de bandas de degradación aumentaba, observándose un primer grupo de 3 bandas de entre 50 y 100 kDa y un segundo grupo de otras 3 bandas de entre 20 y 25 kDa aproximadamente.

En segundo lugar se estudió la degradación en los diferentes tipos de muestra, tomadas de un total de 18 pacientes control no celíacos: 10 muestras de biopsia duodenal procedentes de 10 pacientes PGI, 6 muestras de jugo duodenal procedentes de 6 pacientes PGI y 2 muestras de cepillado duodenal procedentes de 2 pacientes PGI. La **Figura 14** muestra los resultados obtenidos en los tres tipos de muestra duodenal procedentes de 6 pacientes control no celíacos, en representación del total de muestras de pacientes PGI analizadas.

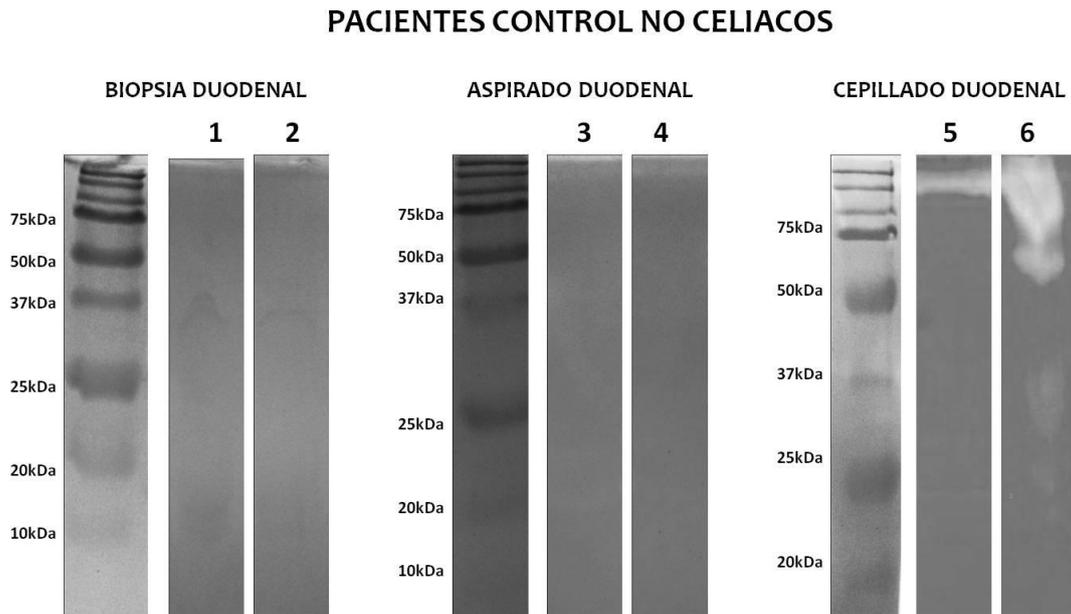


Figura 14: Zimograma de gliadina representativo de varios experimentos independientes utilizando tres tipos de muestra duodenal procedentes todas ellas de diferentes pacientes control no celíacos (PGI). Se estudió la capacidad degradadora de gliadina de extractos proteicos obtenidos de biopsias duodenales (líneas 1 y 2), de muestras de jugo duodenal (líneas 3 y 4) y de muestras de cepillado duodenal (líneas 5 y 6). Junto a cada tipo de muestra está el marcador de peso molecular utilizado en cada experimento. Las bandas de degradación se observan como ausencia de color. Solamente se observó degradación en las muestras de cepillado duodenal.

En ninguna de las muestras de biopsia y jugo duodenal estudiadas se observó ningún tipo de degradación de la gliadina, sin embargo, en las muestras de cepillado duodenal se vio un rastro de degradación menos definido y con un elevado peso molecular.

Finalmente se estudió la degradación en los diferentes tipos de muestra, tomadas de un total de 21 pacientes celíacos en DSG: 4 muestras de biopsia duodenal procedentes de 4 pacientes DSG, 11 muestras de jugo duodenal procedentes de 11 pacientes DSG y 6 muestras de cepillado duodenal procedentes de 6 pacientes DSG. En los tres tipos de muestra se observó degradación de la gliadina, siendo ésta más intensa cuando se trataba de las muestras de jugo duodenal y cepillado duodenal (**Figura 15**).

PACIENTES CELIACOS EN DIETA SIN GLUTEN

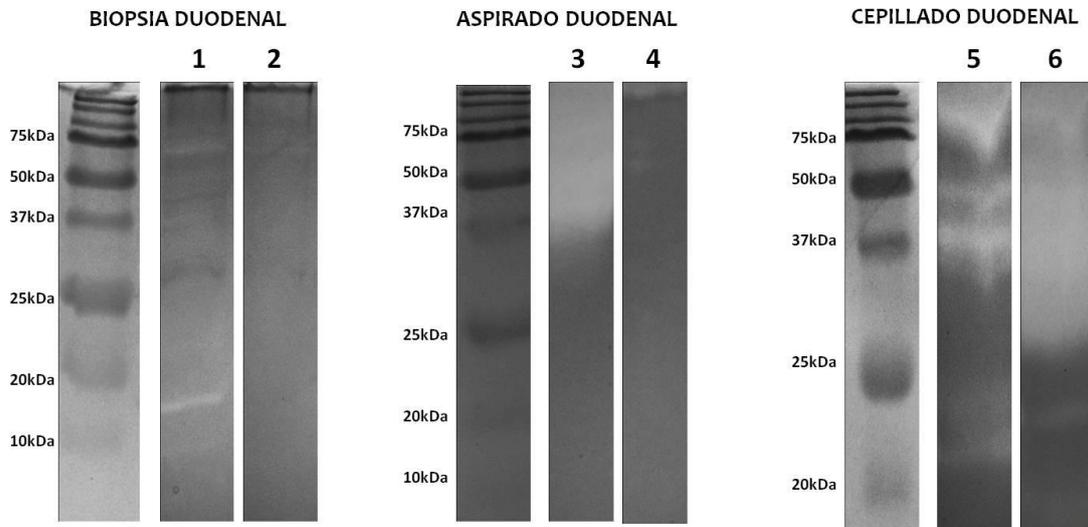


Figura 15: Zimograma de gliadina representativo de varios experimentos independientes utilizando tres tipos de muestra duodenal procedentes todas ellas de diferentes pacientes celíacos en dieta sin gluten (DSG). Se estudió la capacidad degradadora de gliadina de extractos proteicos obtenidos de biopsias duodenales (líneas 1 y 2), de muestras de jugo duodenal (líneas 3 y 4) y de muestras de cepillado duodenal (líneas 5 y 6). Junto a cada tipo de muestra está el marcador de peso molecular utilizado en cada experimento. Las bandas de degradación se observan como ausencia de color. Se observó degradación en todas las muestras estudiadas, siendo más intensa en las muestras de cepillado duodenal.

Para completar el estudio se analizó mediante zimografía el patrón de degradación de la gliadina presente en dos tipos de muestra duodenal procedentes de un mismo paciente. Se incluyeron 4 pacientes celíacos en dieta sin gluten (una muestra de biopsia y una de cepillado de cada uno de ellos) y un paciente celíaco en actividad (una muestra de biopsia y una de jugo duodenal). En la **Figura 16** se muestran los patrones de degradación obtenidos.

DOS TIPOS DE MUESTRA PROCEDENTES DE UN MISMO PACIENTE

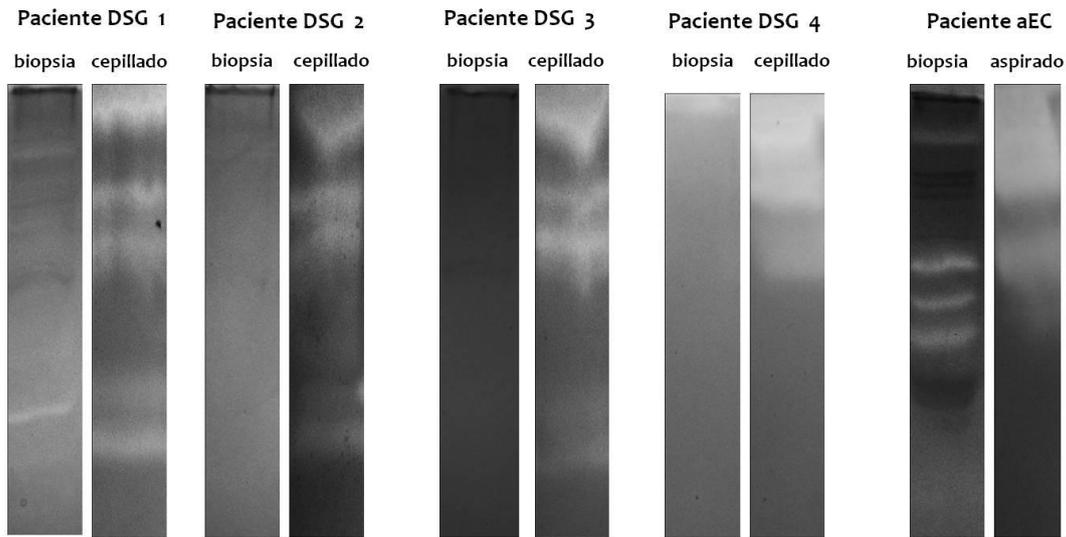


Figura 16: Zimograma de gliadina representativo de varios experimentos independientes utilizando parejas de dos tipos de muestra duodenal procedentes de un mismo paciente. Se estudió la capacidad degradadora de gliadina de extractos proteicos obtenidos de biopsia duodenal y cepillado duodenal de 4 pacientes celíacos en dieta sin gluten (DSG 1-4) y de biopsia duodenal y jugo duodenal de un paciente celíaco en actividad (aEC). Las bandas de degradación se observan como ausencia de color. Al comparar la actividad degradadora en dos tipos de muestra obtenidas de un mismo paciente se observó que en las muestras de cepillado el patrón de degradación es mucho más intenso y definido que en las biopsias intestinales, donde parece haber desaparecido. Sin embargo, en las muestras procedentes de un paciente aEC, el patrón de degradación es más intenso en el jugo duodenal, pero mejor definido en la biopsia.

En el caso de los pacientes DSG, se estudió la actividad degradadora de gliadina en dos tipos de muestra (biopsia duodenal y cepillado duodenal) obtenidos a la vez de un mismo paciente de manera que el gastroenterólogo primero hace un raspado con el cepillo de la zona que va a biopsiar y a continuación toma la muestra de tejido. Al comparar la degradación en ambos tipos de muestra se observó que, las proteasas obtenidas de las biopsias duodenales a penas fueron capaces de degradar la gliadina incluida en el gel, excepto en el paciente DSG 1 donde al menos se detectó una banda de degradación. En cambio, cuando las proteasas provenían de las muestras de cepillado duodenal, en todos los pacientes se detectó una clara actividad degradadora de la gliadina que además presentaba un patrón muy similar al descrito por Bernardo et al [208] en al menos 3 de los pacientes estudiados (DSG 1-3).

En el caso del paciente aEC, se realizó una aspiración directa del jugo duodenal

momento de la toma de la muestra de tejido y sin previo raspado de la zona a biopsiar. En este caso el resultado fue diferente, ya que en ambos tipos de muestra se observó una fuerte actividad degradadora de gliadina. En la biopsia se detectaron claramente al menos 5 proteasas, mientras que en la muestra de jugo duodenal, el degradado aparecía como una mancha.

Creemos que las diferencias observadas tanto en la intensidad como en el patrón de la actividad degradadora podría estar directamente relacionado tanto con la cantidad de proteínas de cada una de las muestras como con la localización de las proteasas en las diferentes zonas de la mucosa intestinal estudiadas. Es importante destacar las diferencias en la degradación observadas entre i) una biopsia duodenal tomada en una zona que previamente ha sido raspada con un cepillo, ii) una muestra de cepillado duodenal y iii) una biopsia duodenal tomada directamente sin previo cepillado de la zona. Aunque se desconozca la cantidad de proteínas presentes en las muestras de cepillado, lo lógico es que sea mucho menor que la presente en las muestra de tejido, por lo tanto consideramos que las diferencias en la actividad degradadora entre ambos tipos de muestra no se deben a diferencias en la cantidad total de proteínas, sino a la cantidad de enzimas capaces de degradar la gliadina.

La capa de mucus que recubre el epitelio intestinal (cepillado) parece tener más cantidad de enzimas capaces de degradar la gliadina que el propio tejido, y además, podrían estar siendo secretadas al lumen intestinal ya que en las muestras de jugo duodenal la actividad degradadora se mantiene de una forma intensa pero con unas bandas de degradación menos definidas.

5.4.3 El péptido 8-mer aparece únicamente en cereales tóxicos para los celíacos y tiene una secuencia que se solapa o está próxima a tres epítomos de gluten ya descritos.

El patrón de proteasas degradadoras de gliadina específicas de la mucosa duodenal de los pacientes celíacos descrito en trabajos anteriores permitió la identificación de un péptido nuevo (8-mer) derivado de la ω -gliadina durante dicha digestión (antecedentes capítulo V, página 62). Este péptido fue identificado en la gliadina, sin embargo se desconocía si estaba presente en otras prolaminas. Uno de los objetivos planteados en esta tesis doctoral fue el estudio de la presencia de este péptido en las proteínas de gluten tóxicas para los pacientes celíacos mediante un estudio *in silico* del péptido 8-mer.

En primer lugar se realizaron alineamientos de secuencia con el programa BLASTP del servidor NCBI que revelaron varias secuencias homólogas del péptido 8-mer que se restringían a las prolaminas y gluteninas de los cereales que resultan tóxicos para los pacientes celíacos como trigo, cebada y centeno. No se encontró ninguna secuencia del péptido 8-mer en los cereales no tóxicos para los celíacos como arroz o maíz.

Se identificó al menos una copia entera del péptido en 10 especies diferentes de los siguientes géneros de gramíneas: *Hordeum*, *Triticum*, *Lophopyrum*, *Aegilops* y *Secale* (**Tabla 11**). Las prolaminas que presentaron mayor número de copias del péptido 8-mer fueron la ω -gliadina de *Triticum* con 87 péptidos encontrados, y la ω -secalina de *Secale* con 160 péptidos encontrados.

Prolaminas	Proteína	Núm. acceso	Puntuación	Núm. péptidos
Hordeína	C-hordein storage protein, partial (<i>Hordeum vulgare</i>)	gi 123461	152	1
	B3-hordein (<i>Hordeum vulgare</i>)	gi 123459	137	1
	C-hordein (<i>Hordeum vulgare</i>)	gi 442524	582	2
	C-hordein (<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>Vulgare</i>)	gi 442524	659	3
Glutenina	D-type LMW* glutenin subunit (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 208605344	724	3
γ-gliadina	γ-gliadin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 379319141	223	1
ω-gliadina	ω-gliadin storage protein (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 10444084	489	3
	ω-gliadin partial (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 224747073	647	3
	ω-gliadin partial (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 224746065	621	5
	ω-gliadin partial (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 224747071	716	5
	Putative ω-gliadin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 63252971	775	3
	ω-gliadin partial (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 224747067	799	6
	ω-gliadin partial (<i>Triticum urartu</i>)	gi 294998471	483	4
	ω-gliadin partial (<i>Triticum urartu</i>)	gi 294998469	647	3
	ω-gliadin partial (<i>Triticum urartu</i>)	gi 294998467	685	5
	ω-gliadin partial (<i>Triticum urartu</i>)	gi 294998465	679	6
	ω-gliadin partial (<i>Triticum monococcum</i> subsp. <i>aegilopoides</i>)	gi 294998463	540	1
	ω-gliadin partial (<i>Triticum monococcum</i> subsp. <i>aegilopoides</i>)	gi 294998461	631	1
	ω-gliadin partial (<i>Triticum monococcum</i>)	gi 294998449	674	2
	ω-gliadin partial (<i>Triticum monococcum</i>)	gi 294998453	645	1
	ω-gliadin partial (<i>Triticum monococcum</i>)	gi 294998455	567	2
	ω-gliadin partial (<i>Triticum monococcum</i> subsp. <i>aegilopoides</i>)	gi 294998461	631	1
	ω-gliadin partial (<i>Triticum monococcum</i>)	gi 294998449	674	2
	ω-gliadin partial (<i>Triticum monococcum</i>)	gi 294998453	645	1
	ω-gliadin partial (<i>Triticum monococcum</i>)	gi 294998455	567	2
	ω-gliadin partial (<i>Triticum monococcum</i>)	gi 294998457	713	1
	ω-gliadin partial (<i>Triticum monococcum</i>)	gi 294998451	647	1
	ω-gliadin partial (<i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>paleocolchicum</i>)	gi 281398157	678	2
ω-gliadin partial (<i>Lophopyrum elongatum</i>)	gi 224747083	647	1	
ω-gliadin partial (<i>Lophopyrum elongatum</i>)	gi 224747089	666	1	
ω-gliadin partial (<i>Lophopyrum elongatum</i>)	gi 224747087	656	2	

Prolaminas	Proteína	Núm. acceso	Puntuación	Núm. péptidos
	ω -gliadin partial (<i>Triticum aestivum</i> x <i>Lophopyrum elongatum</i>)	gi 224747080	647	1
	ω -gliadin partial (<i>Triticum aestivum</i> x <i>Lophopyrum elongatum</i>)	gi 224747075	652	4
	ω -gliadin partial (<i>Triticum aestivum</i> x <i>Lophopyrum elongatum</i>)	gi 224747078	703	6
	ω -gliadin (<i>Aegilops markgrafii</i>)	gi 410025837	612	2
	ω -gliadin (<i>Aegilops markgrafii</i>)	gi 410025835	578	2
	ω -gliadin (<i>Aegilops markgrafii</i>)	gi 410025829	668	3
	ω -gliadin (<i>Aegilops markgrafii</i>)	gi 410025833	676	3
	ω -gliadin (<i>Aegilops markgrafii</i>)	gi 410025831	759	4
	ω -gliadin partial (<i>Aegilops tauschii</i>)	gi 373430784	592	1
	ω -gliadin partial (<i>Aegilops tauschii</i>)	gi 50313199	781	3
ω-secalina	Putative ω -secalin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 226247119	196	1
	Putative ω -secalin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 226247117	202	1
	Putative ω -secalin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 226247115	286	2
	Putative ω -secalin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 226247113	205	2
	Putative ω -secalin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 226247111	290	1
	Putative ω -secalin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 226247109	315	2
	Putative ω -secalin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 226247107	328	1
	Putative ω -secalin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 226247105	313	1
	Putative ω -secalin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 226247103	327	1
	Putative ω -secalin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 226247101	310	1
	Putative ω -secalin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 226247099	359	2
	Putative ω -secalin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 226247097	289	3
	Putative ω -secalin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 226247095	317	4
	Putative ω -secalin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 226247093	392	3
	Putative ω -secalin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 226247091	334	2
	Putative ω -secalin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 225625618	295	2
	Putative ω -secalin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 225625624	366	3
	Putative ω -secalin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 225625620	399	2
	Putative ω -secalin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 225625622	416	3
	Putative ω -secalin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 225625614	463	1
	Putative ω -secalin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 225625616	444	4
	ω -secalin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 229610236	516	2
	ω -secalin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 229610230	573	4
	ω -secalin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 229610226	700	5
	ω -secalin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 229610238	698	4
	ω -secalin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 229610234	699	5
	ω -secalin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 229610232	577	5
	ω -secalin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 229610228	703	6
	Putative ω -secalin (<i>Triticum aestivum</i>)	gi 225625626	708	6
	ω -secalin (<i>Secale cereale</i>)	gi 2145025	692	4
	Sec1 precursor (<i>Secale cereale</i>)	gi 21202	677	6
	ω -secalin (<i>Secale cereale</i>)	gi 229610198	661	4
	ω -secalin (<i>Secale cereale</i>)	gi 229610196	687	6
	ω -secalin (<i>Secale cereale</i>)	gi 229610194	654	5
	ω -secalin (<i>Secale cereale</i>)	gi 229610192	685	5
	ω -secalin (<i>Secale cereale</i>)	gi 229610190	664	5
	Sec1 precursor (<i>Secale cereale</i>)	gi 21204	669	6

Prolaminas	Proteína	Núm. acceso	Puntuación	Núm. péptidos
	ω -secalin (<i>Secale cereale</i>)	gi 229610196	687	6
	ω -secalin (<i>Secale cereale</i>)	gi 229610194	654	5
	ω -secalin (<i>Secale cereale</i>)	gi 229610192	685	5
	ω -secalin (<i>Secale cereale</i>)	gi 229610190	664	5
	Sec1 precursor (<i>Secale cereale</i>)	gi 21204	669	6
	ω -secalin (<i>Triticum aestivum x Secale cereale</i>)	gi 229610219	661	6
	ω -secalin (<i>Triticum aestivum x Secale cereale</i>)	gi 229610217	700	6
	ω -secalin (<i>Triticum aestivum x Secale cereale</i>)	gi 229610215	645	4
	ω -secalin (<i>Secale cereale x Triticum durum</i>)	gi 229610210	704	6
	ω -secalin (<i>Secale cereale x Triticum durum</i>)	gi 229610208	696	6
	ω -secalin (<i>Secale cereale x Triticum durum</i>)	gi 229610206	687	6
	ω -secalin (<i>Secale cereale x Triticum durum</i>)	gi 229610204	699	6

Tabla 11: Alineamientos de secuencia del péptido 8-mer realizados utilizando el programa BLASTP v.2.2.20 de la base de datos NCBI. Las secuencias de proteínas están agrupadas de acuerdo al tipo de prolamina (γ -gliadina, ω -gliadina, ω -secalina, hordeína y glutenina). En la tabla se indica el número de copias del péptido 8-mer encontradas en cada secuencia.

LMW (Low Molecular Weight)= Gluteninas de bajo peso molecular.

Además, se realizó una búsqueda en las proteínas que contenían el péptido 8-mer de los epítomos de gluten de células T ya identificados como específicos de los pacientes celíacos y restringidos a las moléculas HLA-DQ [62]. Como se muestra en la **Tabla 12**, el péptido 8-mer aparece solapado con tres epítomos de gluten de células T.

El epítomo QQPFPQQPQ fue el más repetido, solapando con el péptido 8-mer en un 34.5% de las copias del péptido encontradas en la ω -gliadina, con un 13.1% de las encontradas en la ω -secalina, con un 14.3% en el caso de la hordeína y con un 33.45% de las copias encontradas en la glutenina. Dos epítomos más (QQPQQPFPQ y PFPQQQPF), a pesar de no solapar con el péptido 8-mer, se encontraban muy cerca de su secuencia y además de una manera más abundante en la ω -secalina que en otras prolaminas.

Prolaminas	Epítomos de células T	Péptidos
γ-gliadina	QQPQQPFPQ	QQP. FPLQPQQP .FPQ <u>QQPQQPFPQ</u> .X
ω-gliadina	QQPFPQQPQ QQPQQPFPQ	QQX. FPLQPQQP .FPQ <u>QQPQQP</u> QQX. FPLQPQQP .FPQ <u>QQPQQPFPQ</u> .X QL <u>QQPFPQQPQQP</u> . FPLQPQQP .FP
ω-secalina	QQPFPQQPQ PFPQPQQPF	QQX. FPLQPQQP .FPQ <u>QQP</u> QQX. FPLQPQQP .SPQQPQL <u>PFPQPQQP</u> FEVVVV
Hordeína	QQPFPQQPQ PFPQPQQPF	QQP. FPLQPQQP .FPQ <u>QQPQQPFPQPQQPFR</u> QQPFPQPQQP. FPLQPQQP .FP
Glutenina	QQPFPQQPQ QQPQQPFPQ	S. FPLQPQQP .FPQ <u>QQPQQPFPQP</u> <u>QQPQQPFPQPQQP</u> . FPLQPQQP .FP

Tabla 12: 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.

Los estudios *in silico* realizados en esta tesis han permitido identificar más de 250 secuencias homólogas del péptido 8-mer en prolaminas de cereales tóxicos para los pacientes celíacos, que además, aparecen solapan con un epítomo de gluten con cierta frecuencia. Estos hallazgos sugirieron la posibilidad de que el péptido 8-mer pudiera tener un efecto tóxico directo sobre el epitelio de los pacientes celíacos y que además, pudiera ser reconocido por las células T a través de las moléculas HLA, y desencadenar una respuesta inmune en los pacientes celíacos.

Capítulo VI

**Alteraciones en el epitelio
intestinal tras el estímulo con
péptidos de gluten y/o muestras de
jugo y cepillado duodenal de
pacientes celíacos**

6.1 Antecedentes

La detección de actividad degradadora de gliadina, específica de los pacientes celíacos, en muestras de jugo y cepillado duodenal nos llevó a pensar que quizás la propia composición de esas muestras en esos pacientes pudiera tener algún efecto perjudicial sobre el epitelio intestinal, haciéndolo más susceptible a la toxicidad de los péptidos. En primer lugar, quisimos saber si las uniones estrechas entre las células epiteliales se veían alteradas tras su estímulo con las muestras de jugo duodenal, barajando la hipótesis de que el contenido duodenal de los pacientes celíacos, de alguna manera, podría alterar la permeabilidad intestinal y permitiendo el paso de un mayor número de péptidos a la lámina propia.

Como se ha explicado en el capítulo I de este trabajo, las alteraciones provocadas en el epitelio intestinal de los pacientes celíacos tras el contacto directo con los péptidos derivados de la digestión del gluten han sido descritas en varios trabajos. Los cambios estructurales de las uniones estrechas de los enterocitos se han observado tanto a nivel morfológico como de expresión de las proteínas responsables de mantener en equilibrio la permeabilidad celular. Además, según la teoría patogénica de la EC basada en una doble señal, los péptidos de gluten desencadenan una primera respuesta inmune innata, caracterizada por la entrada de las células epiteliales en una situación de estrés, que se manifiesta como un incremento en la secreción de citocinas pro-inflamatorias, expresión de receptores de estrés, apoptosis celular y debilitamiento de las uniones estrechas entre otras.

Es evidente que el factor desencadenante de la enfermedad celíaca son las proteínas de gluten, los cuales provocan importantes cambios en la permeabilidad intestinal. Desde hace tiempo se baraja la posibilidad de que los pacientes celíacos presenten ciertas alteraciones en la permeabilidad intestinal, anteriores al daño provocado por los péptidos de gluten.

6.2 Objetivos concretos

1. Estudiar mediante inmunofluorescencia cambios estructurales en las proteínas de las uniones estrechas tras estimular las células Caco-2 con muestras de jugo duodenal de pacientes celíacos e individuos control.
2. Analizar los niveles de expresión de IL-15, TGF- β , MICA, Ocludina y ZO-1 en células Caco-2 estimuladas con muestras de jugo y cepillado duodenal de pacientes celíacos e individuos control.
3. Analizar los niveles de expresión de IL-15, TGF- β , MICA, Ocludina y ZO-1 en un modelo de células Caco-2 estimuladas con dos péptidos derivados de gluten antes y después de incubar las células con las muestras de jugo y cepillado duodenal.

6.3 Material y métodos.

● Materiales

26. Línea celular Caco-2 (Epithelial and adherent Caco-2 cells, p44, Health Protection Agency, Reino Unido).
27. DMEM/High glucose (ThermoFisher Scientific, España)
28. FBS, Fetal Bovine Serum (Cultek, España)
29. Aminoácidos no esenciales NEAA (MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100x), ThermoFisher Scientific, España)
30. HEPES Buffer Solution (1M) (Gibco, Life Technologies, España)
31. Penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich, Alemania).
32. Placa de 24 pocillos: Falcon, Tissue Culture Treated by Vacuum Gas Plasma, Polystyrene, (Becton Dickinson, Francia).
33. Flask de 25cm³ (ThermoFisher Scientific, España)
34. Transwell (24 pocillos, tamaño de poro 0.4µm, ThermoFisher Scientific, España)
35. Rabbit polyclonal to ZO1 tight junction protein (ab59720, Abcam, Reino Unido)
36. Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (H+L) (A11012, Life Technologies S.A, España)
37. DAPI (Sigma-Aldrich, Alemania)
38. Medio de montaje (Vectashield mounting médium for fluorescence H-1000, Vector Laboratories, USA).
39. Microscopio de fluorescencia (Microscopio "UpRigth", Motorizado en Z, con Cámara DigitalDXM1200C Nikon Eclipse 80i, USA).
40. Medio de congelación Bambanker (Serum-Free Cell Freezing Medium, Nippon Genetics Europe, Alemania)
41. Crioviales (Cultek Molecular Bioline, España)
42. Tryple (ThermoFisher Scientific, España)
43. Tampón fosfato salino (PBS without Phenol red, without Ca²⁺ without Mg²⁺ (Lonza, Cambrex Iberia, España)
44. RNALater® solution (Ambion Inc, USA).

45. Trizol®, Tri Reagent (Applied Biosystems, Life Technologies, USA).
46. Agua estéril libre de nucleasas (ThermoFisher Scientific, España).
47. High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems Life Technologies, España).
48. iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, USA).
49. NanoDrop® (ThermoFisher Scientific, España)
50. LightCycler 480 Multiwell Plate 96, White (Roche, España).
51. DC™ Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, USA).
52. Péptidos sintéticos (Biomedal, España)

● Métodos

1. Línea celular Caco-2

Las células Caco-2 son células derivadas de adenocarcinoma de colon humano y se diferencian de forma espontánea para formar monocapas confluentes de células polarizadas estructural y funcionalmente simulando el epitelio del intestino delgado. Las monocapas de células Caco-2 son utilizadas como modelo *in vitro* para predecir la absorción de drogas en humanos y estudiar dichos mecanismos. Las células caco-2 tienen un inusual elevado grado de diferenciación, que junto con el hecho de que estas células se diferencian de forma espontánea en un medio normal que contenga suero, las convierte en una de las líneas celulares principales en estudios de transporte epitelial [119]. Tras 20-30 días de cultivo, una vez que han llegado a confluencia, estas células muestran de forma gradual polaridad morfológica y niveles de hidrolasas de borde en cepillo que pueden compararse con lo que ocurre en las células maduras del intestino. El borde en cepillo se desarrolla de forma progresiva. Entre los 5 y 20 días posteriores a la confluencia el espacio ocupado por cada una de las células comienza a reducirse y comienzan a formarse uniones intercelulares. En este momento incluso la longitud y densidad de las microvellosidades incrementa. A los 30 días de haber alcanzado la confluencia, la superficie ocupada por cada célula alcanza su mínimo y es ahí cuando se considera que las células Caco-2 presentan una morfología típica de enterocitos.

Las características morfológicas y ultraestructurales de éstas células son muy heterogéneas a través de la monocapa. Se diferencian 3 estados celulares durante el cultivo de las caco:

- Células homogéneamente indiferenciadas (desde su siembra hasta que alcanzan el 80% de confluencia)
- Células heterogéneamente diferenciadas (hasta los 20 días siguientes a la confluencia)
- Células homogéneamente polarizadas y diferenciadas (30 días o más después de la confluencia)

Tras 21 días de cultivo, las células caco forman uniones estrechas intercelulares bien desarrolladas dando lugar a una barrera de permeabilidad selectiva que constituyen el paso limitante en la vía de transporte paracelular. Estudios realizados en el año 2004 por Daniel R Clayburgh et al [217] demostraron que estas uniones son estructuras capaces de alterar la permeabilidad celular en respuesta a diferentes estímulos.

2. Cultivo, mantenimiento y estímulo de las células Caco-2

2.1 Congelación

Las células adheridas en cultivo en un *Flask* se lavaron con PBS y a continuación fueron tratadas con 5ml de tripsina durante 3 min a temperatura ambiente. A continuación, se agregaron 10ml de medio de cultivo DMEM sin suplementar para inactivar la tripsina y se centrifugaron durante 5 min a 1200 rpm. Tras retirar la tripsina, se procedió al conteo de las células para su resuspensión en el medio de congelación Bambanker a razón de 1 millón/ml/criovial. Tras su congelación a -80°C durante 24h, se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

2.2 Descongelación

Para la descongelación de las células, se sumergió el vial en el baño a 37°C durante 5 minutos y se resuspendió en 5ml de medio DMEM sin suplementar. Tras una centrifugación de 5 min a 1200 rpm, el precipitado se resuspendió en 15ml medio de cultivo completo: DMEM (4mM de L-glutamina, 4500mg/l de Glucosa y piruvato de sodio) suplementado con: 15% de FCS, 0,01 M de HEPES, 1% de NEAA y 1% de

Penicilina-estreptomicina. A continuación se procedió a sembrar las células con el medio de cultivo completo en botellas *Flasc* de 25cm² y fueron incubadas a 37°C y 5% de CO₂. Antes de sembrar las células necesarias para realizar los experimentos, se realizaron al menos 3 pases.

2.3 Pases

Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ cambiando el medio cada 2 días hasta que llegaron al 80% de confluencia. En ese momento se retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS y se trataron con 5ml de tripsina durante 5 min a temperatura ambiente. Una vez que las células se habían despegado, se agregaron 15ml de medio de cultivo para inactivar la tripsina y de ahí, se pasaron a dos botellas nuevas haciendo una dilución 1:2. Una vez que se realizaron los 3 pases, se sembraron las células en placas de 24 pocillos, a razón de 50.000/pocillo/1ml de medio DMEM completo y se dejaron crecer durante 7 días cambiando el medio cada dos días.

3. Estímulos para estudios de expresión molecular por QPCR

A los 7 días, tras hacer un lavado, se agregaron los estímulos correspondientes.

Jugo duodenal

- Grupos de estudio: aEC (n=2), DSG (n=2) y PGI (n=2). Todos por duplicado.
- Condiciones de estímulo: Se agregó el jugo duodenal en medio DMEM completo (al 2% de FCS) en un volumen final de 1ml y 0.05% (v/v) de la muestra. Se incubó durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂.

Cepillado duodenal

- Grupos de estudio: aEC (n=2), DSG (n=2) y PGI (n=2). Todos por duplicado.
- Condiciones de estímulo: Se agregó el cepillado duodenal en medio DMEM completo (al 2% de FCS) en un volumen final de 1ml y 0.05% (v/v) de la muestra. Se incubó durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂.

Péptidos

- Péptido 33-mer desaminado: LQLQPFQPELPYPQPELPYPQPELPYPQPF
- Péptido 8-mer desaminado: FPLQPEQP
- Péptido 8-mer control: FPLQPHQP
- Condiciones de estímulo: Se agregó el péptido correspondiente a una concentración de 25,5µM en 1ml de medio de cultivo completo al 2% de FCS/pocillo. Se incubó durante 16 horas a 37°C y 5% de CO₂.

4. Inmunofluorescencia

El estudio de las uniones estrechas (*Tight Junctions*) en la línea celular Caco-2 tras los diversos estímulos se realizó mediante inmunofluorescencia en *transwell* (TW) de acuerdo al siguiente protocolo que fue estandarizado para este trabajo:

Las células se sembraron en los TW a razón de 20.000 células/TW en 200µl de medio de cultivo completo al 15% de FCS en la parte superior del TW, y 1ml de medio de cultivo completo al 20% de FCS en la parte inferior. El medio de cultivo se cambió entre las 6-16h posteriores a la siembra.

Al sexto día de crecimiento se agregó el estímulo correspondiente en la parte superior del TW: Se utilizaron 9 muestras de jugo duodenal procedentes de 3 pacientes control no celiacos (PGI), 3 pacientes celiacos en actividad (aEC) y 3 pacientes celiacos en dieta sin gluten (DSG). De cada uno se agregaron 50µl por TW, y se estudiaron por duplicado. Además, se incluyeron dos estímulos con gliadina y gluten (50µg/ml). Todos los estímulos fueron de 24 horas a 37°C y 5% de CO₂ y a continuación se retiró el medio de cultivo y se hizo un lavado con PBS a 4°C.

Las células fueron fijadas en metanol absoluto, a -20°C durante toda la noche. Una vez fijadas, se permeabilizaron con acetona que se dejó actuar durante 1 minuto, y se retiró, permitiendo que se secase el TW. A continuación se realizó un lavado con PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Para bloquear las uniones inespecíficas se agregó PBS al 5% de FCS que se incubó durante 30 minutos a 37°C y 5% de CO₂.

Para la incubación con el anticuerpo primario, se agregó 1µg/ml en un volumen de 200µl arriba y 1ml debajo de solución de bloqueo del anticuerpo anti-Zo-1 y se incubó toda la noche a 4°C. Tras realizar dos lavados con PBS a 4°C, se

- Lavado: lavar dos veces con PBS a 4°C arriba y abajo, se agregó el anticuerpo secundario (Alexa Fluor 594) diluido 1:500 en la solución de bloqueo: 200µl en la parte superior y 1ml en la parte inferior del TW y se incubó 2 horas a temperatura ambiente y oscuridad. Una vez más se realizaron dos lavados con PBS a 4°C arriba y abajo y se agregó el marcador del núcleo celular (DAPI) diluido 1:2000 en la solución de bloqueo: 200µl en la parte superior y 1ml en la parte inferior del TW. Tras una última incubación de 2 minutos a temperatura ambiente y oscuridad, se hicieron dos lavados con PBS a 4°C y un lavado con agua destilada. Las membranas de los TW se recortaron y se colocaron boca abajo sobre el portaobjetos donde previamente se había añadido una gota del medio de montaje.

5. Retrotranscripción del ARN a ADN complementario (RT-PCR)

Mediante la transcriptasa reversa, el ARN se transcribió a ADN complementario (ADNc) usando el kit “*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*” y utilizando *primers* al azar.

6. Análisis de expresión molecular por PCR cuantitativa (QPCR)

Esta técnica permite determinar los niveles de expresión de ARNm de diferentes moléculas (**Tabla 13**). Para ello se utilizó el *LightCycler*® 480. Las reacciones se realizaron con *iTaq*TM *Universal SYBR*[®] *Green Supermix*, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Todos los primers fueron diseñados utilizando el *Primer Blast*, de NCBI y sintetizados en MWG biotech.

Se realizó una cuantificación relativa de la expresión de genes utilizando el método 2 delta-delta Ct [218]. Los resultados fueron analizados utilizando el programa estadístico GraphPad Prism (GraphPad Software, USA), aplicando el test no paramétrico *two tailed Mann-Whitney U*, considerando el nivel de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media.

Molécula	Secuencia de los primer	°C
GADPH	Fw: 5' GAA GGT GAA GGT CGA GTC 3' Rv: 5' GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC 3'	60°C
TGF-β	Fw: 5' GGA CAC CAA CTA TTG CTT CAG 3' Rv: 5' TCC AGG CTC CAA ATG TAG G 3'	60°C
Ocludina	Fw: 5' CGA AGA AAG ATG GAC AGG TAT GAC 3' Rv: 5' AAG TCA TCC AGA GGT GAA GT 3'	60°C
ZO-1	Fw: 5' AGA GAT GAA CGG GCT ACG CTA 3' Rv: 5' TTT ACA GGA GTT GAG ACA GCC C 3'	60°C
MICA	Fw: 5' TTG ACA GGG AAC GGA AAG GA 3' Rv: 5' CCA GGT TTT GGG AGA GGA AGA 3'	60°C
IL-15	Fw: 5' CCA ACT GGG TGA ATG TAA TAA GTG 3' Rv: 5' CAG ATT CTG TTA CAT TCC CAT TAG AAG A 3'	60°C

Tabla 13: Moléculas estudiadas por PCR cuantitativa y primer empleados para cada una de ellas.

Los resultados obtenidos del análisis mediante PCR cuantitativa de los niveles de expresión de las diferentes moléculas se representan como el *Fold Change* o número de veces que la expresión de dicha molécula tras el estímulo correspondiente incrementa o disminuye con respecto al estado basal (marcado en las gráficas con una línea discontinua).

6.4 Resultados

6.4.1 El jugo duodenal de los pacientes celíacos altera la estructura de las uniones estrechas en las células Caco-2, de forma similar a la gliadina y el gluten.

Mediante un modelo *in vitro* de células Caco-2 cultivadas en *transwell*, se estudió el efecto en la estructura de las uniones estrechas tras el estímulo de las células con muestras de jugo duodenal de los diferentes grupos de pacientes (3 pacientes aEC, 3 pacientes PGI y 3 pacientes DSG). Para ello, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia en el que se marcó la proteína Zo-1 de las TJs en las células Caco-2 estimuladas.

En la **Figura 17** se muestran las imágenes de fluorescencia representativas de los ensayos realizados. Como puede observarse en la primera imagen, las uniones estrechas en estado basal confieren a las membranas un aspecto estriado. Cuando las células Caco-2 fueron estimuladas con el jugo duodenal de un paciente PGI, las membranas celulares tenían un aspecto similar al que presentaban en estado basal, sin embargo, cuando el jugo duodenal procedía de un paciente aEC, las células epiteliales se alargaban y sus membranas aparecían mucho más estiradas. Si el paciente celíaco ya seguía una dieta libre de gluten, la presencia del jugo duodenal no alteraba la estructura de las membranas celulares. En cuanto a los estímulos con gliadina y gluten, en ambos casos se observó el mismo efecto que ocurría con la muestra de jugo duodenal de los pacientes aEC: las membranas celulares se estiraban.

Las TJs son un elemento central en la regulación de la permeabilidad intestinal ya que mantienen la contingencia de las células epiteliales [219]. El incremento en la permeabilidad intestinal se considera uno de los cambios biológicos que precede a la enfermedad celíaca [220]. Existen numerosos estudios que demuestran el efecto de la gliadina en la función de la barrera intestinal [221-222].

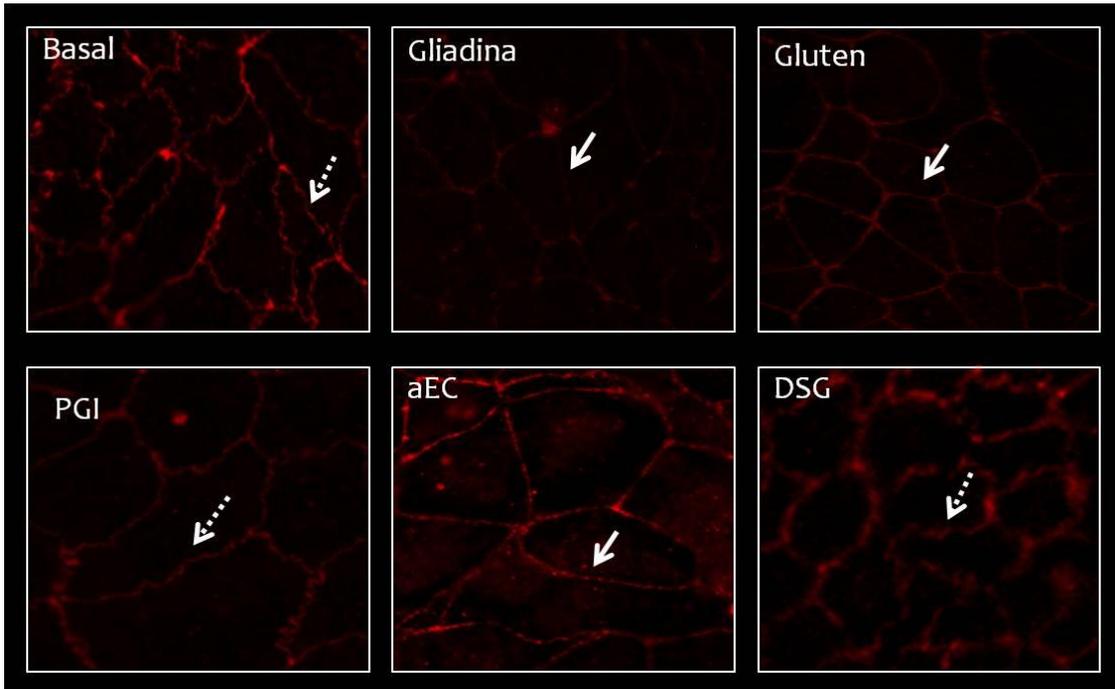


Figura 17: Inmunofluorescencia de la proteína Zo-1 de las uniones estrechas en células Caco-2. Imágenes de microscopía de fluorescencia (40x) representativas de dos ensayos utilizando un total de 9 muestras por duplicado de jugo duodenal (3 muestras de pacientes PGI, 3 muestras de pacientes aEC y 3 muestras de pacientes DSG). Condiciones experimentales: células caco-2 en estado basal (Basal), células Caco-2 estimuladas durante 24 horas con 50µl de jugo duodenal de un paciente PGI (PGI), células Caco-2 estimuladas durante 24 horas con 50µl de jugo duodenal de un paciente aEC (aEC), células Caco-2 estimuladas durante 24 horas con 50µl de jugo duodenal de un paciente DSG (DSG), células Caco-2 estimuladas durante 24 horas con 50µg/ml de gliadina (Gliadina) y células Caco-2 estimuladas durante 24 horas con 50µg/ml de gluten (Gluten). Las flechas discontinuas marcan las membranas de las células cuando la estructura de las uniones estrechas no parece alterada (membranas estriadas) y las flechas continuas marcan las membranas cuando la estructura de las uniones estrechas ha sido alterada por el estímulo (membranas lisas).

Los análisis funcionales, estructurales y moleculares demuestran que las uniones estrechas o TJs entre las células del epitelio intestinal están alteradas en los pacientes con enfermedad celiaca [128]. Se ha descrito como la gliadina induce cambios en la morfología de las membranas de los enterocitos. Las uniones estrechas o TJs se vuelven más débiles, lo que hace que las membranas se estiren, produciendo el alargamiento celular [223]. Hemos observado como el contenido del jugo duodenal de los pacientes aEC, provoca una alteración en las TJs muy similar al observado con los estímulos de gliadina y gluten. Sin embargo, parece que tras la retirada del gluten de la dieta, se recupera la estructura normal de las uniones intercelulares.

Nuestros resultados son comparables a los observados tras el estímulo de las células Caco-2 con gliadina digerida con pepsina y tripsina (PT-gliadina) [224].

6.4.2 Las muestras de jugo duodenal de los pacientes celíacos disminuyen la expresión de TGF- β y aumentan la de MICA en las células Caco-2.

Para los estudios de expresión molecular se utilizaron cultivos en placa de células Caco-2 (material y métodos página 93).

En primer lugar quisimos estudiar el efecto de las muestras de jugo duodenal y cepillado duodenal en la expresión por parte de las células epiteliales de una de las citocinas pro-inflamatorias claves en la EC, la IL-15, y del factor de crecimiento transformante o TGF- β , por su papel como citocina anti-inflamatoria en dicha enfermedad. Para realizar estos ensayos, se utilizó un total de 12 muestras duodenales procedentes de 12 pacientes diferentes: 6 muestras de jugo duodenal (de 2 pacientes aEC, 2 pacientes DSG y 2 pacientes PGI) y 6 muestras de cepillado duodenal (de 2 pacientes aEC, 2 pacientes DSG y 2 pacientes PGI).

Los valores representan el *fold change* con respecto al estado basal, y el análisis estadístico se realizó entre los valores de expresión obtenidos tras el estímulo con las muestras de los pacientes aEC o DSG y los obtenidos con las muestras de los pacientes PGI. El análisis estadístico se realizó de forma independiente en las muestras de jugo duodenal y de cepillado duodenal.

En la **Figura 18** se muestran los niveles de expresión de IL-15 en las células Caco-2 estimuladas. En todos los casos se produjo un incremento de la expresión de la IL-15. Los niveles eran ligeramente superiores tras el estímulo con las muestras de cepillado, sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos de pacientes.

Niveles de expresión de IL-15 en células Caco-2

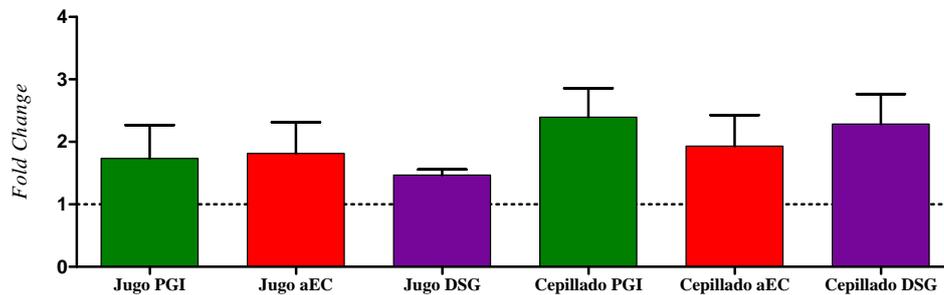


Figura 18: Niveles de expresión de IL-15 en células Caco-2. Las células fueron estimuladas durante 24h con 50µl de jugo duodenal y 20µl de cepillado duodenal de pacientes control no celiacos (PGI), pacientes celiacos en actividad (aEC) y pacientes celiacos en dieta sin gluten (DSG). Se representa el *Fold Change* o número de veces que se incrementa la expresión de la molécula con respecto al estado basal (línea discontinua) como la media ± error estándar de la media. El valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

En cuanto al TGF-β, todos los estímulos, independientemente del tipo de muestra y del paciente, disminuyeron sus niveles de expresión (**Figura 19**), y además, se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.0023$) entre los niveles de expresión del TGF-β en las células epiteliales estimuladas con jugo duodenal de pacientes aEC y PGI.

Niveles de expresión de TGF-β en células Caco-2

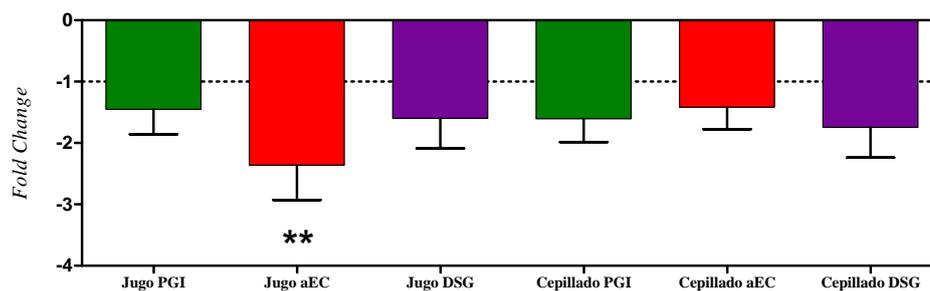


Figura 19: Niveles de expresión de TGF-β en células Caco-2. Las células fueron estimuladas durante 24h con 50µl de jugo duodenal y 20µl de cepillado duodenal de pacientes control no celiacos (PGI), pacientes celiacos en actividad (aEC) y pacientes celiacos en dieta sin gluten (DSG). Se representa el *Fold Change* o número de veces que se incrementa la expresión de la molécula con respecto al estado basal (línea discontinua) como la media ± error estándar de la media. El valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo (** $p < 0.01$).

El siguiente paso fue estudiar si el contacto directo de las células epiteliales con el contenido de las muestras duodenales de pacientes control y pacientes celíacos, provocaba la expresión de alguna molécula de estrés como MICA. Como se observa en la **Figura 20**, en este caso las diferencias entre los pacientes control no celíacos y los pacientes celíacos se acentuaban cuando las células se estimulaban con las muestras de jugo duodenal.

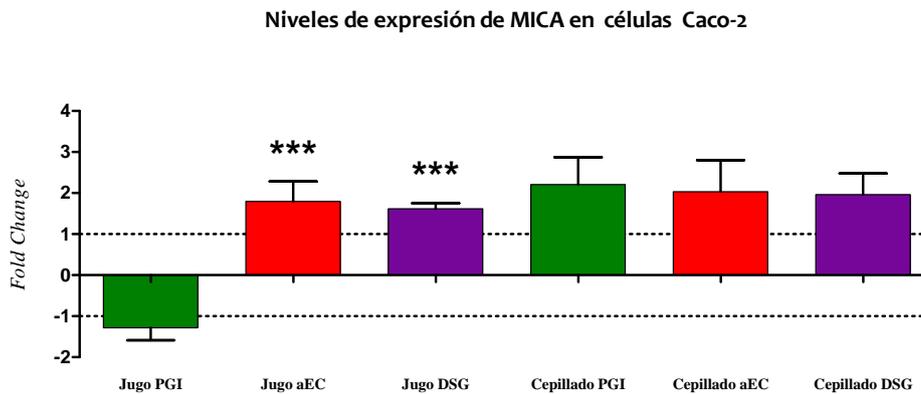


Figura 20: Niveles de expresión de MICA en células Caco-2. Las células fueron estimuladas durante 24h con 50µl de jugo duodenal y 20µl de cepillado duodenal de pacientes control no celíacos (PGI), pacientes celíacos en actividad (aEC) y pacientes celíacos en dieta sin gluten (DSG). Se representa el *Fold Change* o número de veces que se incrementa la expresión de la molécula con respecto al estado basal (línea discontinua) como la media \pm error estándar de la media. El valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo (***) $p < 0.001$.

Las muestras de jugo duodenal de los pacientes celíacos, independientemente de la dieta, aumentaban los niveles de expresión de la molécula MICA, de una manera estadísticamente significativa en comparación con las muestras de jugo duodenal de los pacientes control PGI. Sin embargo, aunque todas las muestras de cepillado duodenal inducían la expresión de MICA, no se observaron diferencias entre los 3 tipos de pacientes.

6.4.3 Las muestras de cepillado duodenal de los pacientes celíacos disminuyen la expresión de Ocludina y Zo-1 en las células Caco-2.

Las alteraciones morfológicas observadas de las membranas de las células Caco-2 tras su estímulo con las muestras de jugo duodenal de pacientes aEC, nos llevaron a plantearnos la posibilidad de que estas muestras duodenales también produjeran cambios en los niveles de expresión de las principales proteínas que componen las TJs: Ocludina y Zo-1. En la **Figura 21** se representan los niveles de expresión de Ocludina por las células Caco-2 tras ser estimuladas con los dos tipos de muestra duodenal de los distintos grupos de estudio. Todos los estímulos estudiados incrementaban la expresión de la Ocludina con respecto al estado basal. Las muestras de cepillado duodenal de los pacientes aEC disminuían de forma significativa los niveles de expresión de la Ocludina con respecto a los conseguidos tras el estímulo con los cepillados duodenales de los pacientes PGI y de los pacientes DSG.

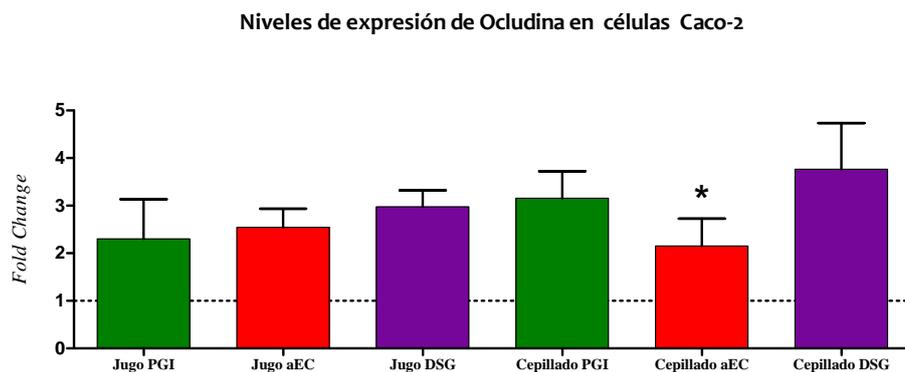


Figura 21: Niveles de expresión de Ocludina en células Caco-2. Las células fueron estimuladas durante 24h con muestras de jugo y cepillado duodenal de pacientes control no celíacos (PGI), pacientes celíacos en actividad (aEC) y pacientes celíacos en dieta sin gluten (DSG). La línea discontinua marca el nivel basal de expresión. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) se indican como *.

El estímulo de las células caco-2 con las muestras de jugo duodenal incrementó la expresión de la proteína Zo-1 (**Figura 22**) con respecto al estado basal, independientemente del tipo de paciente. Las muestras de cepillado duodenal de los pacientes aEC, disminuyeron de forma significativa la expresión de Zo-1 con respecto al cepillado de los pacientes PGI.

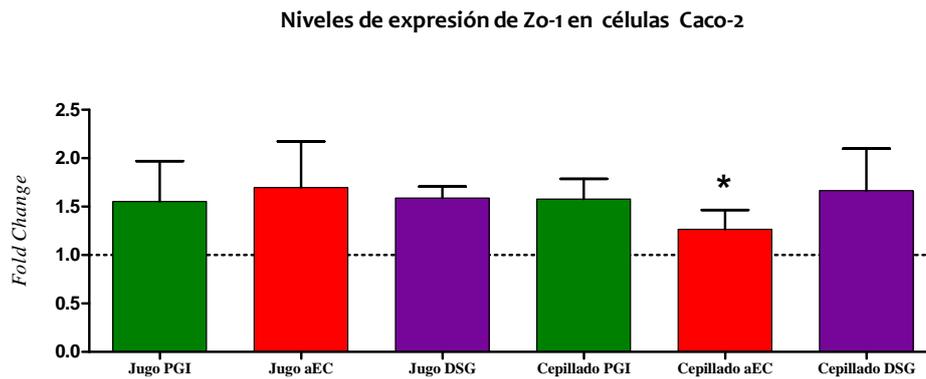


Figura 22: Niveles de expresión de Zo-1 en células Caco-2. Las células fueron estimuladas durante 24h con muestras de jugo y cepillado duodenal de pacientes control no celíacos (PGI), pacientes celíacos en actividad (aEC) y pacientes celíacos en dieta sin gluten (DSG). La línea discontinua marca el nivel basal de expresión. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) se indican como *.

6.4.4 Las muestras de cepillado duodenal de los pacientes celíacos favorecen el incremento en la expresión de la IL-15 provocada por los péptidos 8-mer y 33-mer en las células caco-2.

Una vez estudiado el efecto de las muestras de jugo duodenal y cepillado duodenal sobre el modelo *in vitro* de células epiteliales, nos preguntamos si de alguna manera podrían condicionar el daño producido por los péptidos tóxicos sobre el mismo en los pacientes celíacos. En caso de que la composición del jugo y/o del cepillado duodenal fuera diferente en los pacientes celíacos y en los controles no celíacos, ¿sería capaz de favorecer o proteger respectivamente al epitelio intestinal frente a la toxicidad de los péptidos derivados del gluten? Para ello, se realizaron varios experimentos en los cuales, las células caco-2 eran incubadas durante 24 horas con las muestras de jugo duodenal y cepillado duodenal utilizadas en el ensayo anterior y posteriormente, estimuladas durante 16 horas con el péptido 8-mer, el péptido 33-mer o un péptido control del 8-mer, cuya secuencia era idéntica al 8-mer salvo en un aminoácido. También se estudió el efecto sobre las células epiteliales de los péptidos solos, sin previa incubación con las muestras duodenales. En todos los casos se analizó la expresión de las moléculas estudiadas en el ensayo anterior: IL-15, TGF- β , MICA, Ocludina y Zo-1.

Se observó que cuando las células Caco-2 son estimuladas con las muestras de jugo y cepillado duodenal de los tres grupos de pacientes, no se producen cambios significativos en los niveles de expresión de la **IL-15** (Figura 18). Tampoco se observaron cambios tras estimular las células con los tres péptidos (8-mer, 8-mer control y 33-mer) (**Figura 23**). Sin embargo, el efecto de estos péptidos en la expresión de la IL-15 cambia cuando las células son previamente incubadas con las muestras de cepillado duodenal (**Figura 23**). El péptido 8-mer, previa incubación de las células con muestras de cepillado duodenal de pacientes PGI y aEC, incrementa significativamente la expresión de IL-15. El péptido 8-mer control tiene un efecto similar, sin embargo, la estadística confirma que su incremento de la expresión de la IL-15 tras la incubación con el cepillado duodenal de pacientes aEC es menos significativo que el producido por el péptido 8-mer. Finalmente, las muestras de cepillado duodenal de pacientes aEC también incrementan el efecto del péptido 33-mer, aumentando de forma significativa los niveles de expresión de la IL-15.

Nuestros resultados muestran como los péptidos por si solos no modifican los niveles de expresión de esta citocina, sin embargo, en presencia de las muestras de cepillado duodenal, los péptidos inducen un incremento en la expresión de la IL-15 por las células Caco-2.

Se ha demostrado que la IL-15 induce cambios en el epitelio intestinal en la EC [225], y que los enterocitos de los pacientes celíacos en actividad producen mayor cantidad de esta citocina en comparación con los pacientes tratados con una DSG y los pacientes control no celíacos [226] y además los niveles de expresión de la IL-15 están directamente relacionados con el grado de atrofia intestinal. Por otro lado, los péptidos tóxicos como el 19-mer y el 33-mer, inducen una respuesta inmune innata inespecífica caracterizada por la presencia de IL-15 producida por los enterocitos. En un modelo de cultivo ex vivo de biopsia duodenal de pacientes aEC se ha observado que la respuesta inmediata inducida por el péptido 33-mer se asocia a la expresión de IL-15 por células mononucleares de la lámina propia [227], sin embargo el principal mecanismo depende de la liberación de IL-15 por los enterocitos [226]. La IL-15 actúa como mediador de la respuesta innata y la lesión epitelial, además de promover la supervivencia de los linfocitos T específicos y el mantenimiento de la respuesta inflamatoria [228].

Niveles de expresión de IL-15 en células Caco-2

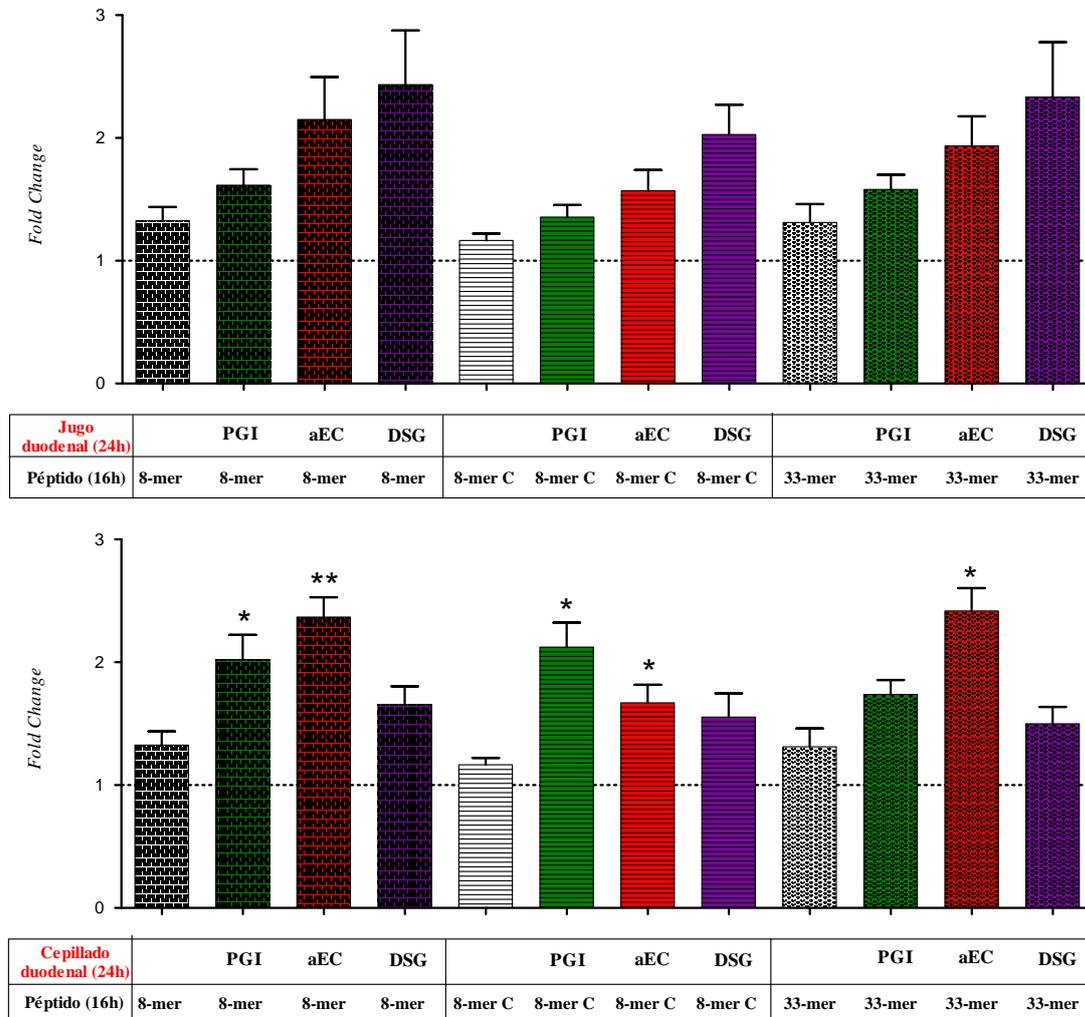


Figura 23: Niveles de expresión de IL-15 en células Caco-2. Las células fueron estimuladas durante 24h con muestras de jugo duodenal (arriba) y cepillado duodenal (abajo) de pacientes control no celíacos (PGI), pacientes celíacos en actividad (aEC) y pacientes celíacos en dieta sin gluten (DSG). Posteriormente, se estimularon durante 16 horas con el péptido 8-mer (8-mer), péptido 8-mer control (8-mer C) y péptido 33-mer (33-mer), todos ellos a una concentración de 25.5µM. La línea discontinua marca el nivel basal de expresión. Las diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) se indican como * y (p<0.01) como **.

6.4.5 Las muestras de jugo duodenal de los pacientes celíacos favorecen la disminución en la expresión del TGF- β provocada por el péptido 33-mer en las células caco-2.

En relación al **TGF- β** , el estímulo de las células Caco-2 con muestras de jugo duodenal de pacientes aEC disminuyó de forma significativa sus niveles de expresión (Figura 19). Tras el estímulo de las células epiteliales con los tres péptidos (**Figura 24**), no se observaron diferencias en los niveles de expresión del TGF- β , sin embargo, cuando las células fueron pre-incubadas con las muestras de jugo duodenal de los pacientes aEC, se observó como el péptido 33-mer disminuía de forma significativa los niveles de expresión del TGF- β en comparación al efecto del péptido en solitario (**Figura 24**).

En estudios iniciales llevados a cabo por Lahat *et al* [229], observaron como en la EC activa existía un incremento en la expresión de transcritos de TGF- β comparado con los individuos control. Por el contrario, Lionetti *et al* [230] observaron que los niveles de expresión del ARN total del TGF- β no diferían entre los pacientes aEC y los individuos control, aunque si que destacaron que la producción del TGF- β en los pacientes aEC provenía de las células T de la lámina propia y macrófagos mientras que en los individuos control la producción mayoritaria la realizaban las células epiteliales. Se cree que durante procesos crónicos de inflamación, la vía de señalización del TGF- β es inhibida por citocinas inflamatorias, alterando la homeostasis del sistema inmune [231]. En el año 2007 se publicó un trabajo [232] en el que se demostraba como la IL-15 inhibía la vía de señalización del TGF- β en la enfermedad celíaca.

Niveles de expresión de TGF-β en células Caco-2

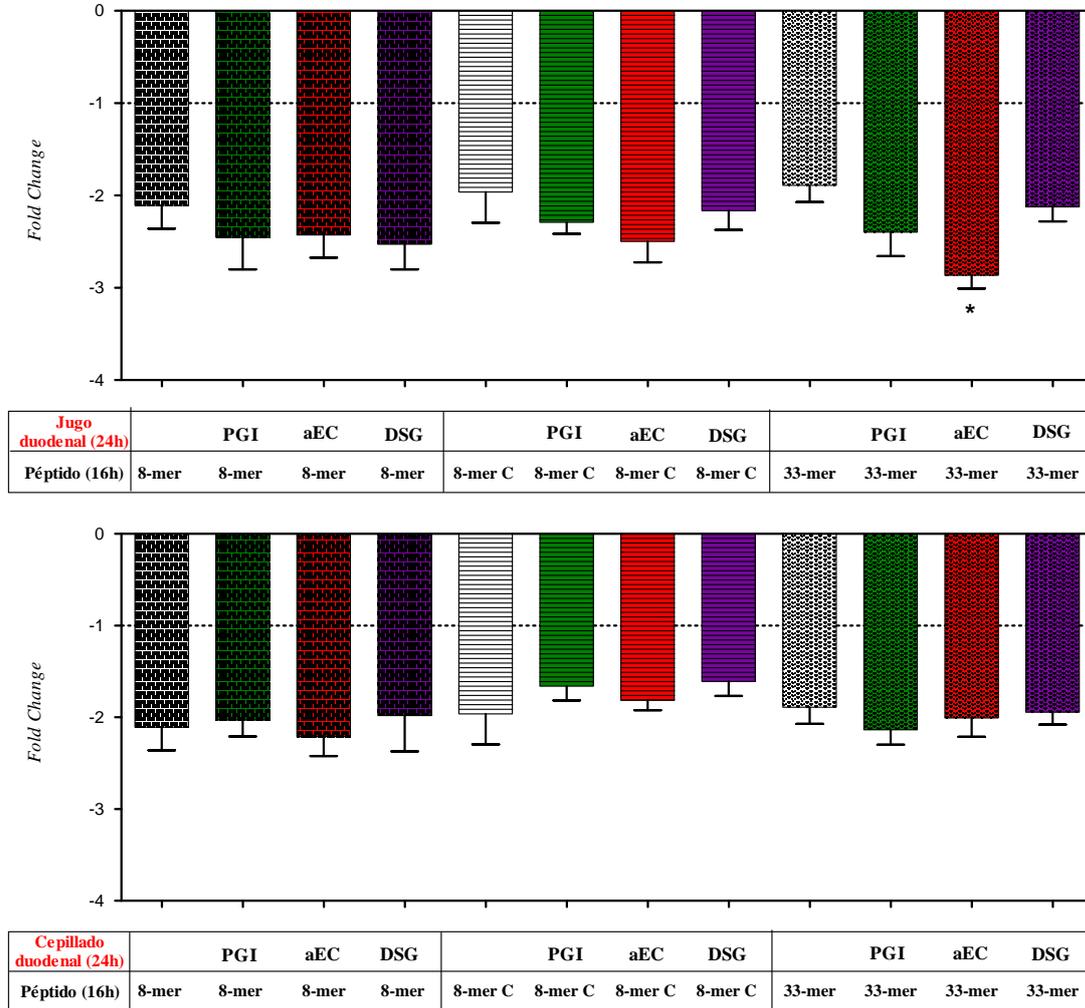


Figura 24: Niveles de expresión de TGF-β en células Caco-2. Las células fueron estimuladas durante 24h con muestras de jugo duodenal (arriba) y cepillado duodenal (abajo) de pacientes control no celíacos (PGI), pacientes celíacos en actividad (aEC) y pacientes celíacos en dieta sin gluten (DSG). Posteriormente, se estimularon durante 16 horas con el péptido 8-mer (8-mer), péptido 8-mer control (8-mer C) y péptido 33-mer (33-mer), todos ellos a una concentración de 25.5µM. La línea discontinua marca el nivel basal de expresión. Las diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) se indican como * y (p<0.01) como **.

6.4.6 Las muestras de cepillado duodenal de los pacientes control no celíacos contrarrestan el incremento en la expresión de MICA provocado por los péptidos 8-mer y 33-mer en las células caco-2.

Como se observa en la Figura 20, la expresión de **MICA** aumentó de forma significativa tras el estímulo de las células Caco-2 con las muestras de jugo duodenal de pacientes aEC y DSG. Los péptidos 8-mer y 33-mer tuvieron el mismo efecto, sin embargo en este caso el péptido control del 8-mer disminuyó la expresión de MICA (**Figura 25**). La incubación previa de las muestras con el jugo duodenal de los pacientes aEC y DSG, contrarrestó de forma significativa el efecto de los péptidos 8-mer y 33-mer, disminuyendo la expresión de MICA. Este mismo efecto se observó con las muestras de cepillado duodenal de los pacientes PGI.

El incremento de la expresión de MICA tras el estímulo de las células Caco-2 con el jugo duodenal de los pacientes celíacos (aEC y DSG) y con dos péptidos derivados de gluten (8-mer y 33-mer) es similar al observado tras estimular biopsias intestinales de pacientes celíacos con gliadina [233]. MICA es considerada como una molécula inducida por estrés capaz de activar la respuesta inmune en las primeras etapas de la enfermedad.

Niveles de expresión de MICA en células Caco-2

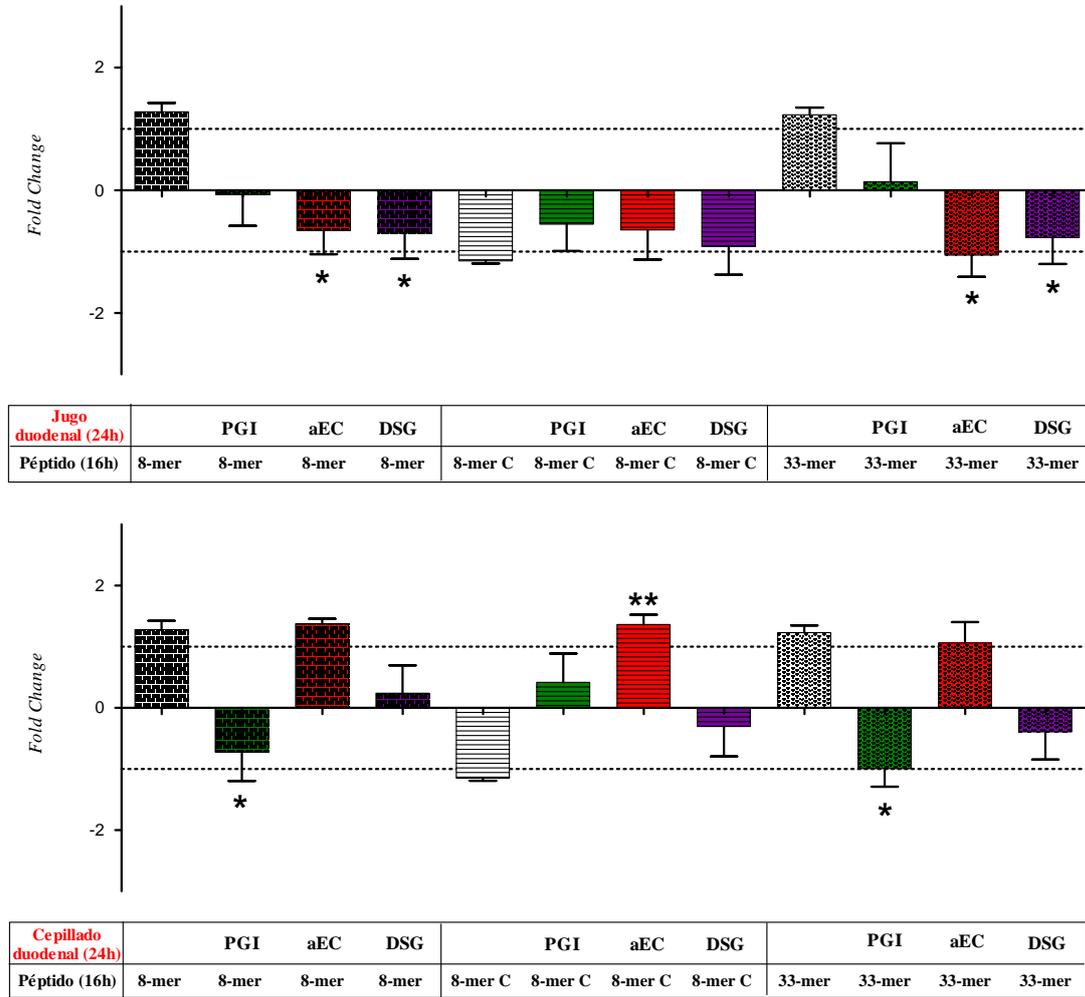


Figura 25: Niveles de expresión de MICA en células Caco-2. Las células fueron estimuladas durante 24h con muestras de jugo duodenal (arriba) y cepillado duodenal (abajo) de pacientes control no celíacos (PGI), pacientes celíacos en actividad (aEC) y pacientes celíacos en dieta sin gluten (DSG). Posteriormente, se estimularon durante 16 horas con el péptido 8-mer (8-mer), péptido 8-mer control (8-mer C) y péptido 33-mer (33-mer), todos ellos a una concentración de 25.5µM. La línea discontinua marca el nivel basal de expresión. Las diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) se indican como * y (p<0.01) como **.

6.4.7 Las muestras de cepillado duodenal de los pacientes control no celíacos y de los pacientes celíacos en dieta sin gluten contrarrestan el incremento en la expresión de Zo-1 provocada por los péptidos 8-mer y 33-mer respectivamente en las células caco-2.

Se analizaron los niveles de expresión de las dos proteínas principales que componen las uniones estrechas o TJs. En la Figura 21 se observa como las muestras de cepillado duodenal de los pacientes aEC disminuyeron de forma significativa los niveles de expresión de la **occludina**. Los péptidos 8-mer, 8-mer control y 33-mer también incrementaron la expresión de occludina (**Figura 26**), sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos.

Finalmente se analizaron los niveles de expresión de la proteína **Zo-1**. Se observó cómo sus niveles de expresión disminuían cuando las células eran estimuladas con las muestras de cepillado de los pacientes aEC (Figura 22). Los tres péptidos inducían la expresión de la proteína Zo-1 en las células Caco-2 (**Figura 27**) con respecto al basal. Solamente la incubación previa de las células con las muestras de jugo duodenal de pacientes PGI y de cepillado duodenal de pacientes DSG disminuyó significativamente el incremento de la expresión de Zo-1 provocad por el péptido 33-mer.

En condiciones normales, la occludina, situada en la membrana apical de los enterocitos, se une a la Zo-1 fosforilada, localizada en la membrana lateral que su vez se une a los filamentos de actina del citoesqueleto, formando así las uniones estrechas [234], sin embargo en la EC, la falta de fosforilación de la Zo-1 disminuye su unión a la occludina.

Niveles de expresión de Ocludina en células Caco-2

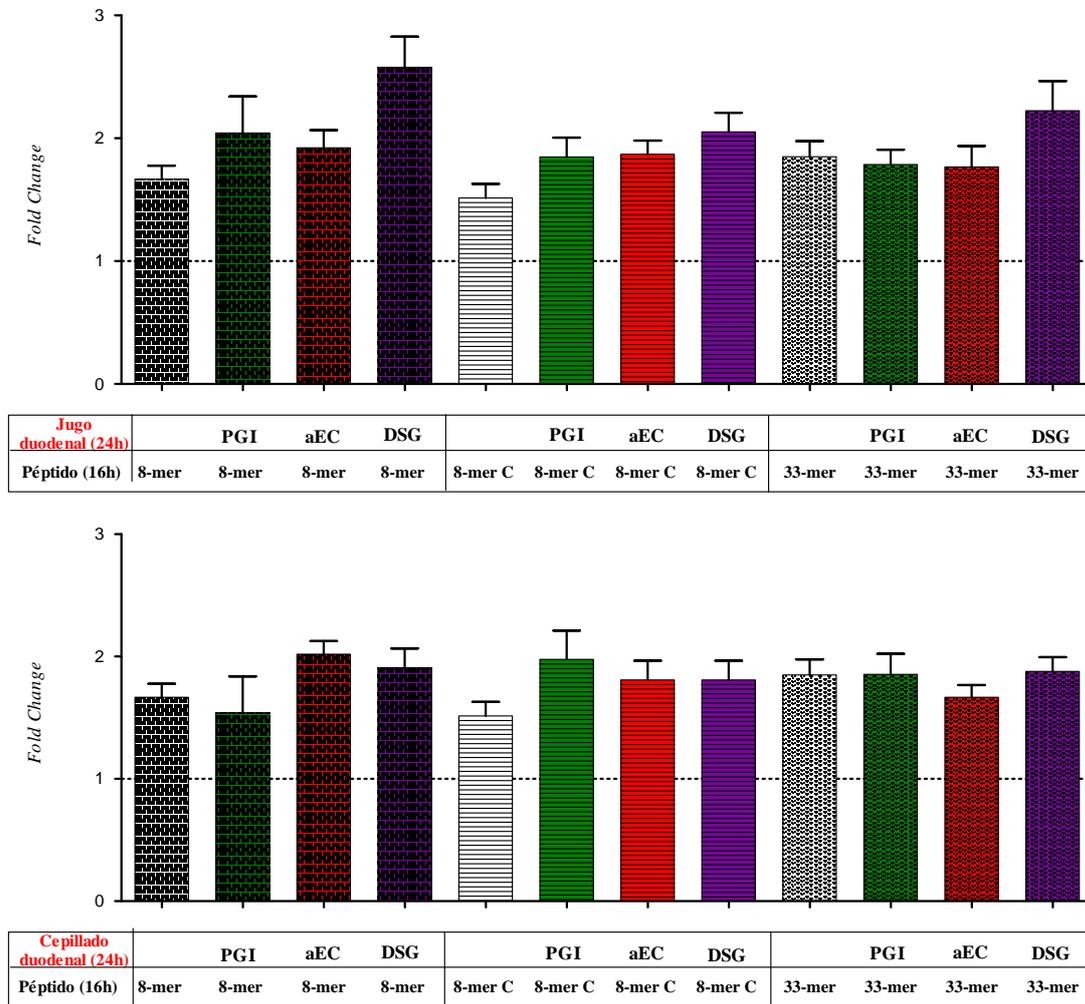


Figura 26: Niveles de expresión de Ocludina en células Caco-2. Las células fueron estimuladas durante 24h con muestras de jugo duodenal (arriba) y cepillado duodenal (abajo) de pacientes control no celíacos (PGI), pacientes celíacos en actividad (aEC) y pacientes celíacos en dieta sin gluten (DSG). Posteriormente, se estimularon durante 16 horas con el péptido 8-mer (8-mer), péptido 8-mer control (8-mer C) y péptido 33-mer (33-mer), todos ellos a una concentración de 25.5µM. La línea discontinua marca el nivel basal de expresión. Las diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) se indican como * y (p<0.01) como **.

Niveles de expresión de Zo-1 en células Caco-2

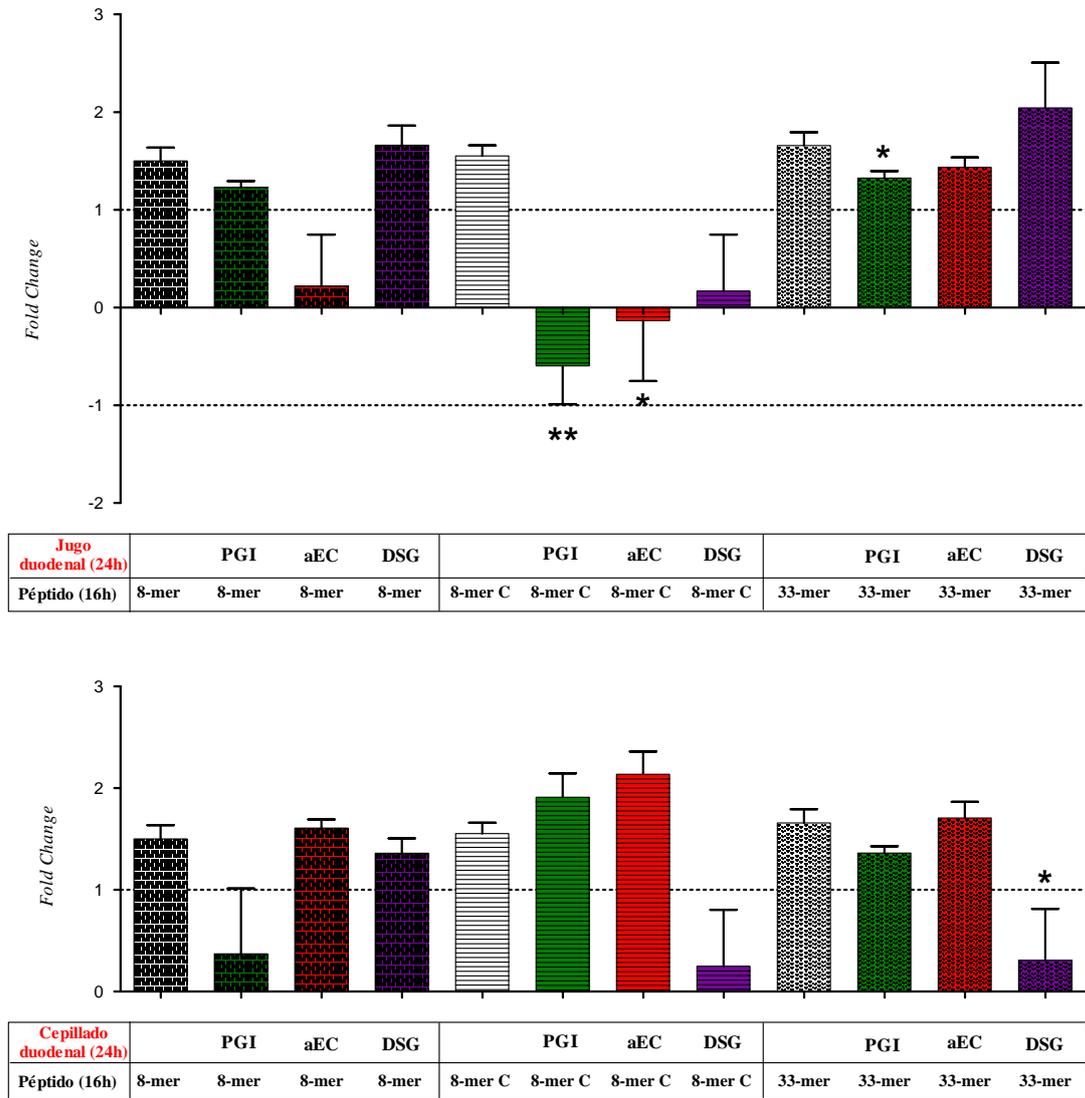


Figura 27: Niveles de expresión de Zo-1 en células Caco-2. Las células fueron estimuladas durante 24h con muestras de jugo duodenal (arriba) y cepillado duodenal (abajo) de pacientes control no celíacos (PGI), pacientes celíacos en actividad (aEC) y pacientes celíacos en dieta sin gluten (DSG). Posteriormente, se estimularon durante 16 horas con el péptido 8-mer (8-mer), péptido 8-mer control (8-mer C) y péptido 33-mer (33-mer), todos ellos a una concentración de 25.5µM. La línea discontinua marca el nivel basal de expresión. Las diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) se indican como * y (p<0.01) como **.

Los análisis de expresión molecular de dos de las proteínas que componen las uniones estrechas de las células del epitelio intestinal revelaron como las muestras de cepillado duodenal de los pacientes aEC disminuyeron la expresión tanto de la ocludina como de la Zo-1 comparado con los niveles detectados tras el estímulo con el cepillado duodenal de los pacientes PGI. Los niveles de expresión de ambas proteínas aumentaron de igual manera tras el estímulo de las células con cualquiera de los tres péptidos sintéticos.

En el caso del 8-mer, su efecto en la expresión de la ocludina y de Zo-1 parecía ligeramente mayor cuando las células se incubaron previamente con los cepillados duodenales de los pacientes aEC. Las muestras de cepillados duodenales de los pacientes DSG, contrarrestaron el efecto inductor de la expresión de la Zo-1 producido por el péptido 33-mer, mientras que en el caso del péptido 8-mer, fueron los cepillados de los pacientes PGI lo que tendieron a disminuir el incremento de la expresión de esta proteína.

Estos resultados parecen indicar que las muestras de jugo duodenal no parecen interferir en el efecto tóxico de los péptidos sobre el epitelio, sin embargo, las muestras de cepillado duodenal de los pacientes celíacos incrementan la expresión de las proteínas de las TJs, efecto que ha sido descrito tras el estímulo con gliadina. Por el contrario, las muestras de cepillado duodenal e los pacientes PGI podrían tener un efecto protector sobre las uniones estrechas del epitelio intestinal.

Capítulo VII

DetECCIÓN DE ANTICUERPOS IgA ESPECÍFICOS FRENTE AL PÉPTIDO 8-MER EN LOS PACIENTES CELIACOS

7.1 Antecedentes

A lo largo de su Tesis Doctoral [211], David Bernardo identificó, mediante el análisis por espectrometría de masas de trampa iónica de una banda de degradación recuperada de un zimograma de gliadina [208], el péptido 8-mer (FPLQPQQP), un péptido corto derivado de la degradación de la γ -gliadina por proteasas duodenales específicas de los pacientes celíacos.

Uno de los principales objetivos de esta Tesis, tratado en el primer capítulo, fue estudiar si este péptido se encontraba formando parte de las prolaminas de los cereales tóxicos para los pacientes celíacos. Mediante alineamientos de secuencia utilizando el BLASTP del servidor NCBI comprobamos que las secuencias homólogas del péptido 8-mer se restringían a las prolaminas y gluteninas de trigo, cebada y centeno, siendo especialmente abundante en la ω -gliadina y ω -secalina.

Ya que el péptido 8-mer derivaba de una degradación de gliadina específica de los pacientes celíacos, y además formaba parte de las proteínas tóxicas para estos pacientes, quisimos estudiar si el péptido 8-mer compartía parte de su secuencia con la de alguno de los epítomos de gluten de células T que se conocen hasta el momento [62]. Como resultado, identificamos un epítomo de gluten (QQFPQQPQ) que se solapaba en el 23% de las secuencias encontradas del péptido 8-mer. Además, existían dos epítomos más de gluten que a pesar de no solapar con el péptido 8-mer se encontraban muy cerca de su secuencia.

Si el péptido 8-mer, derivado de la digestión de la gliadina por proteasas duodenales específicas de los pacientes celíacos, se encuentra solo en las proteínas tóxicas para estos pacientes y cuya secuencia se solapa con epítomos de gluten de células T, cabe la posibilidad de que el péptido 8-mer sea reconocido por las células T y por lo tanto tenga la capacidad de desencadenar una respuesta inmune humoral.

Para averiguarlo, decidimos diseñar un ensayo ELISA que nos permitiera estudiar la presencia de anticuerpos IgA que reconocieran el péptido 8-mer como antígeno específico en el plasma de pacientes celíacos.

7.2 Objetivos concretos

- 1.** Diseñar y estandarizar un ensayo ELISA que permita estudiar en muestras de plasma la presencia de anticuerpos IgA que reconozcan de forma específica el péptido 8-mer en estado nativo o desaminado.
- 2.** Estudiar la presencia de anticuerpos IgA anti-péptido 8-mer en muestras de plasma de pacientes celíacos (tanto en actividad como en dieta sin gluten), pacientes no celíacos e individuos sanos.
- 3.** Estudiar la presencia de anticuerpos IgA anti-péptido 8-mer en muestras de plasma de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal (Colitis Ulcerosa y Enfermedad de Crohn).
- 4.** Ajustar el protocolo optimizado del ensayo ELISA IgA anti-péptido 8-mer para estudiar la presencia de estos anticuerpos en muestras de jugo duodenal de pacientes celíacos.

7.3 Material y métodos

1. Reactivos

53. Péptidos sintéticos (Biomedal S.L, España).
54. Leche descremada en polvo (Sveltesse)
55. Tampón fosfato salino PBS (PBS , Lonza, España).
56. Tween-20 (Sigma-Aldrich, Alemania)
57. Anticuerpo secundario anti-IgA humana conjugado con peroxidasa de rábano (Polyclonal Rabbit Anti-Human IgA/HRP, P0216, DakoCytomation, Dinamarca).
58. Sustrato de la peroxidasa TMB (TMB One Component HRP Microwell Substrate, BioFX, USA).
59. Placa de 96 pocillos recubierta con estreptavidina (Fisher Scientific, España)
60. Placa de 96 pocillos (Maxisorp Nunc-Immuno plate, Nunc, USA)
61. Lector de placas UVM340 Asys Hitech GmbH, Eugendorf, Austria).
62. UltraClean® Blood DNA Isolation Kit
63. Reactivos para la determinación de la molécula HLA-DQ2: kit Kapa Taq.
64. *Primers* para la determinación de las moléculas HLA-DQ2 (MWG Biotech)
 - DQA Fw (5'AGTTGGAGCGTTTAATCAGAC3')
 - DQA Rv (5'ACGGTCCCTCTGGCCAGTA3')
 - DQB Fw (5'GTGCGTCTTGTGAGCAGAAG3')
 - DQB Rv (5'GCAAGGTCGTGCGGAGCT3')
65. Reactivos para la determinación de la molécula HLA-DQ8: kit DQB1 Only SSP2LQB1(One Lambda, INC, Alemania).
66. Determinación de anticuerpos IgA anti-TGt: kit Elia CeliKey IgA y el UniCAP 100^c (Phadia, España).
67. Determinación de anticuerpos IgA anti-endomysio: Anti-endomysium antibodies (AEA), Indirect Immunofluorescence, Monkey Esophagus (Ensomysium) (BioSystems S.A, España).

2. Muestras de estudio

De acuerdo a las características descritas en el apartado “Sujetos de estudio y tipos de muestras empleadas”, en los ensayos que se muestran en este capítulo se emplearon un total de 259 muestras de plasma (**Tabla 14**) y 17 muestras de jugo duodenal (**Tabla 15**).

Sujetos de estudio		n	Niños	Adultos	HLA DQ2/DQ8	IgA-tTG/EMA	Grado de atrofia vellositaria (Marsh)
Pacientes celiacos	aEC	47	31	16	+	+	II-III
	DSG	29	17	12	+	+	II-III
Pacientes no celiacos	SANO	37	10	27	+/-	- (*)	N.D
	PGI	69	23	46	+/-	- (*)	N.D
	C.U	34	0	34	+/-	+/-	N.D
	E. Crohn	43	0	43	+/-	+/-	N.D

Tabla 14: Grupos de pacientes incluidos en la determinación de anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer en muestras de plasma. Se incluyeron pacientes celiacos en actividad (aEC), pacientes celiacos en dieta sin gluten (DSG), individuos sanos (SANO), pacientes no celiacos con otra patología gastrointestinal (PGI), pacientes no celiacos con Colitis Ulcerosa (C.U) y pacientes no celiacos con Enfermedad de Crohn (E. Crohn). (*) la determinación de anticuerpos IgA anti-tTG/EMA se realizó en aquellos pacientes con genética HLA-DQ positiva. N.D = Biopsia no determinada.

Sujetos de estudio		n	Niños	Adultos	HLA DQ2/DQ8	IgA-tTG/EMA	Grado de atrofia vellositaria (Marsh)
Pacientes celiacos	aEC	10	0	10	+	+	II-III
	DSG	3	0	3	+	+	II-III
Pacientes no celiacos	PGI	4	0	4	+/-	-	Normal

Tabla 15: Grupos de pacientes incluidos en la determinación de anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer en muestras de jugo duodenal. Se incluyeron pacientes celiacos en actividad (aEC), pacientes celiacos en dieta sin gluten (DSG) y pacientes no celiacos con otra patología gastrointestinal (PGI).

3. Genotipado HLA-DQ2/DQ8

Se analizó la susceptibilidad genética de desarrollar la enfermedad celiaca de todas las muestras utilizadas en el ensayo ELISA IgA anti-8mer. Para ello se purificó el ADN genómico de la muestra de sangre total, utilizando el kit comercial UltraClean® Blood DNA Isolation Kit, y el genotipado fue realizado mediante PCR utilizando primers específicos de MWG Biotech y el kit comercial Kapa Taq. El análisis del haplotipo HLA-DQ8 se realizó únicamente en las muestras de los pacientes con resultados negativos para HLA-DQ2 utilizando el kit DQB1 Only SSP2LQB1.

4. ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) para la detección de anticuerpos IgA anti-8mer.

El ELISA o Ensayo por inmunoabsorción ligado a un enzima [157], como se ha comentado anteriormente, es una técnica de inmunoensayo utilizado en la detección de un antígeno o un anticuerpo en una muestra biológica. En este trabajo se presenta un ensayo ELISA diseñado y estandarizado para la detección de anticuerpos IgA que reconozcan como antígeno específico el péptido 8-mer derivado de la gliadina.

En este capítulo de la Tesis se detalla la optimización de cada una de las etapas hasta llegar al protocolo definitivo del ensayo ELISA IgA anti-péptido desaminado de gliadina 8-mer (IgA anti-PDG 8-mer), el cual se muestra a continuación:

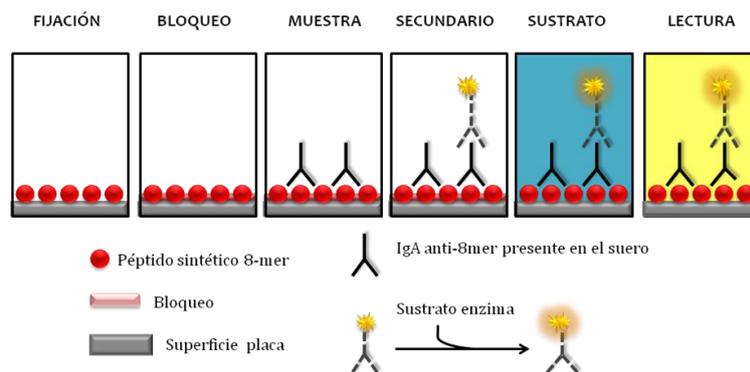
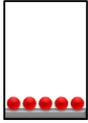


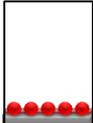
Figura 28: Etapas de las que se compone un Ensayo por Inmunoabsorción ligado a un enzima (ELISA)

FIJACIÓN



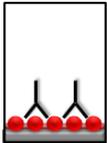
- Agregar 5µg/ml de la combinación de péptidos PEP 2 Y PEP 7 (proporción 1:1) en 100µl de tampón fosfato en cada pocillo.
- Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente
- Realizar 5 lavados con 200µl/pocillo de la solución de lavado, después de cada lavado decantar la placa con un golpe seco.

BLOQUEO



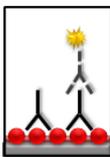
- Agregar 100µl/pocillo de la solución de bloqueo.
- Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Sin lavar, decantar la placa con un golpe seco.

INCUBACIÓN CON LOS SUEROS



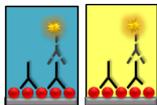
- Agregar las muestras de suero diluidas 1:50 en la solución de bloqueo, a razón de 100µl/pocillo.
- Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Realizar 8 lavados con 200µl/pocillo de la solución de lavado, después de cada lavado decantar la placa con un golpe seco.

INCUBACIÓN CON EL ANTICUERPO SECUNDARIO



- Agregar el anticuerpo secundario (IgA-HRP) diluido 1:500 en la solución de bloqueo, a razón de 100µl/pocillo.
- Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Realizar 8 lavados con 200µl/pocillo de la solución de lavado, después de cada lavado decantar la placa con un golpe seco.

REVELADO Y LECTURA DE LA PLACA



- Agregar 100µl/pocillo del sustrato TMB.
- Incubar durante 20-30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad.
- Detener la reacción agregando sobre el TMB 100µl/pocillo de H₂SO₄ 0.3M.
- Lectura a 450nm.

5. Anticuerpos IgA anti-TGt

Además de la susceptibilidad genética, se analizó la presencia de anticuerpos IgA anti-transglutaminasa tisular (IgA anti-TGt) en todas las muestras incluidas en el ensayo. Para ello se utilizó el kit Elia CeliKey IgA y el UniCAP 100[®] siguiendo el

protocolo recomendado por el fabricante.

6. Anticuerpos IgA anti-endomiso

Para la determinación de los anticuerpos IgA anti-endomiso, en las muestras que lo requerían, se utilizó el método de inmunofluorescencia indirecta utilizando como sustrato tejido de esófago de mono. Se empleó el kit Anti-endomysium antibodies (AEA) de BioSystems, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

7. Síntesis de péptidos

Los péptidos sintéticos y las diferentes modificaciones terminales utilizados en el ensayo ELISA son péptidos derivados de la secuencia del péptido 8-mer que fueron suministrados por la empresa Biomedal S.L (Sevilla, España).

7.4 Resultados

7.4.1 La desaminación del péptido 8-mer incrementa su afinidad de unión con los anticuerpos IgA.

Las moléculas HLA-DQ2/DQ8 tienen preferencia por los residuos de aminoácidos cargados negativamente [235]. La enzima TGt cataliza *in vivo* la desaminación de la glutamina (Q) a ácido glutámico (E), aumentando su afinidad por las moléculas HLA DQ2/DQ8 [236]. La posición de los residuos de Q con respecto al residuo de prolina (P) más cercano al extremo C-terminal del péptido determina el que sean sustrato de la enzima TGt, de manera que la enzima tiene preferencia por los residuos de Q en la secuencia consenso QXP frente a las secuencias QP o QXXP [237-238]. Por esta razón, se estudió el efecto de la desaminación del péptido 8-mer (FPLQPQQP) en su posición 6 (FPLQPEQP).

Para la fijación del péptido a la placa se utilizó el sistema biotina-estreptavidina: al sintetizar el péptido se añade una biotina en uno de sus extremos (N-terminal o C-terminal) y a continuación el péptido biotinilado se incuba en una placa cuya superficie está recubierta por estreptavidina.

Los péptidos utilizados (**Tabla 16**) fueron diseñados y sintetizados por la empresa Biomedal S.L (Sevilla, España). Estos 4 péptidos permitieron comparar el efecto en la formación del complejo antígeno-anticuerpo de: a) la desaminación del péptido, y b) la fijación del péptido a la placa a través de su extremo amino o carboxilo terminal.

PÉPTIDO	SECUENCIA	ESTRUCTURA
PEP-BIO 1	FPLQPQQPK-BIOTIN	8-mer nativo + biotina en extremo C-terminal
PEP-BIO 2	FPLQPEQPK-BIOTIN	8-mer desaminado + biotina en extremo C-terminal
PEP-BIO 3	BIOTIN-FPLQPQQP	8-mer nativo + biotina en extremo N-terminal
PEP-BIO 4	BIOTIN-FPLQPEQP	8-mer desaminado + biotina en extremo N-terminal

Tabla 16: Péptidos sintéticos biotinilados derivados del 8-mer empleados en el estudio del efecto de la desaminación del péptido sobre la afinidad por parte de los anticuerpos IgA (Biomedal S.L). En la tabla se muestran la secuencia de cada uno de los péptidos y la posición de la biotina en su estructura.

En la **Figura 29** se muestran los resultados obtenidos en dos muestras de plasma (un paciente aEC y un paciente PGI) al fijar en la placa tres concentraciones diferentes de cada uno de los péptidos. Aunque los niveles de absorbancia detectados fueron demasiado bajos, como primer paso en la selección de los péptidos el estudio nos permitió descartar aquellos que llevaban unida la biotina en el extremo amino terminal, ya que los niveles de anticuerpos IgA anti-8mer fueron casi inexistentes con independencia del tipo de muestra empleada. Sin embargo, cuando la biotina estaba unida al extremo C-terminal, se detectó un reconocimiento del péptido por parte de los anticuerpos IgA presentes en la muestra de aEC, que además se veía favorecido cuando el péptido 8-mer estaba desaminado. En cuanto a la concentración fijada del péptido, los niveles de absorbancia eran ligeramente superiores al utilizar 5 µg/ml de péptido.

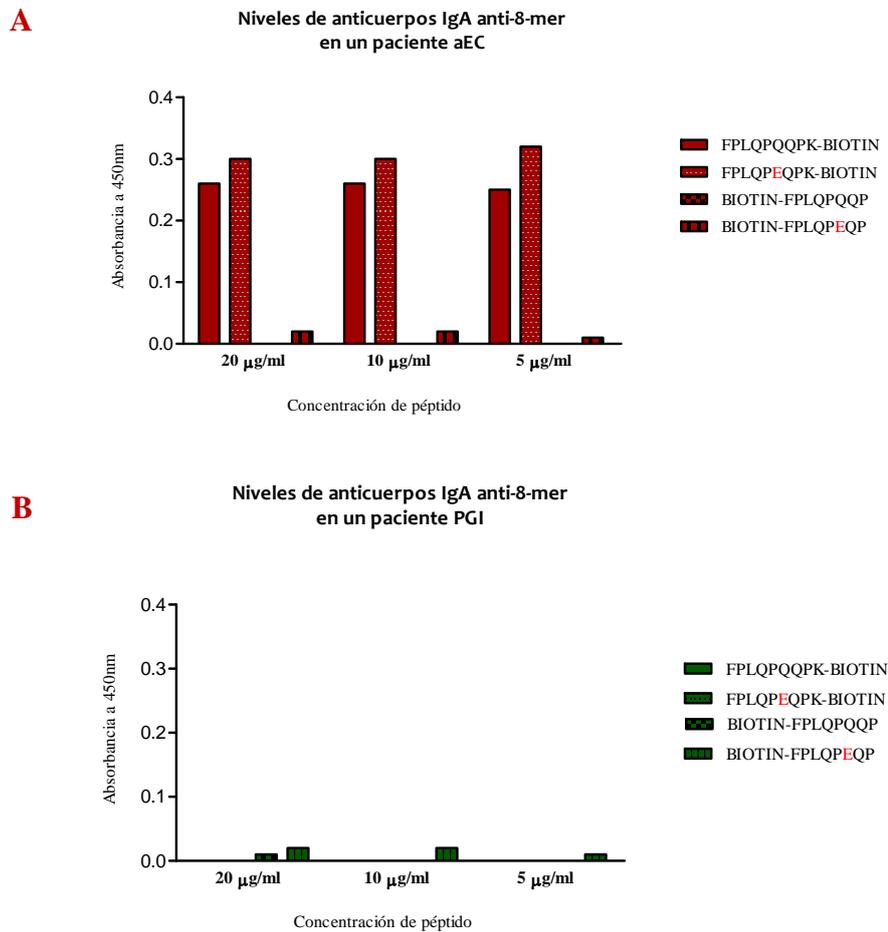


Figura 29: Detección en plasma de anticuerpos IgA frente a 4 péptidos sintéticos biotinilados derivados del 8-mer en estado nativo y desaminado en la posición 6. En este ensayo se fijaron 3 concentraciones diferentes para cada péptido, y se estudió la presencia de anticuerpos IgA anti-8mer en muestras de plasma de un paciente aEC (A) y de un paciente PGI (B).

Una vez seleccionado el extremo del péptido que ofrece mejor reconocimiento (C-terminal) y la concentración adecuada del mismo, decidimos realizar varios ensayos en los que estudiaríamos la presencia de anticuerpos IgA anti-8mer frente al péptido en estado nativo y desaminado en un total de 68 muestras de suero: 28 pacientes aEC, 29 pacientes DSG y 11 pacientes PGI. Como se observa en la **Figura 30**, se detectó la presencia de anticuerpos IgA anti-8mer en ambos casos y además, los niveles eran siempre superiores en los pacientes celíacos (independientemente de la dieta) que en aquellos que no lo son. Al comparar los niveles detectados entre el péptido nativo y el desaminado, se observó como la desaminación favorecía el reconocimiento del péptido principalmente en las muestras de suero de pacientes aEC, incluso los valores observados en los pacientes PGI disminuían con la desaminación.

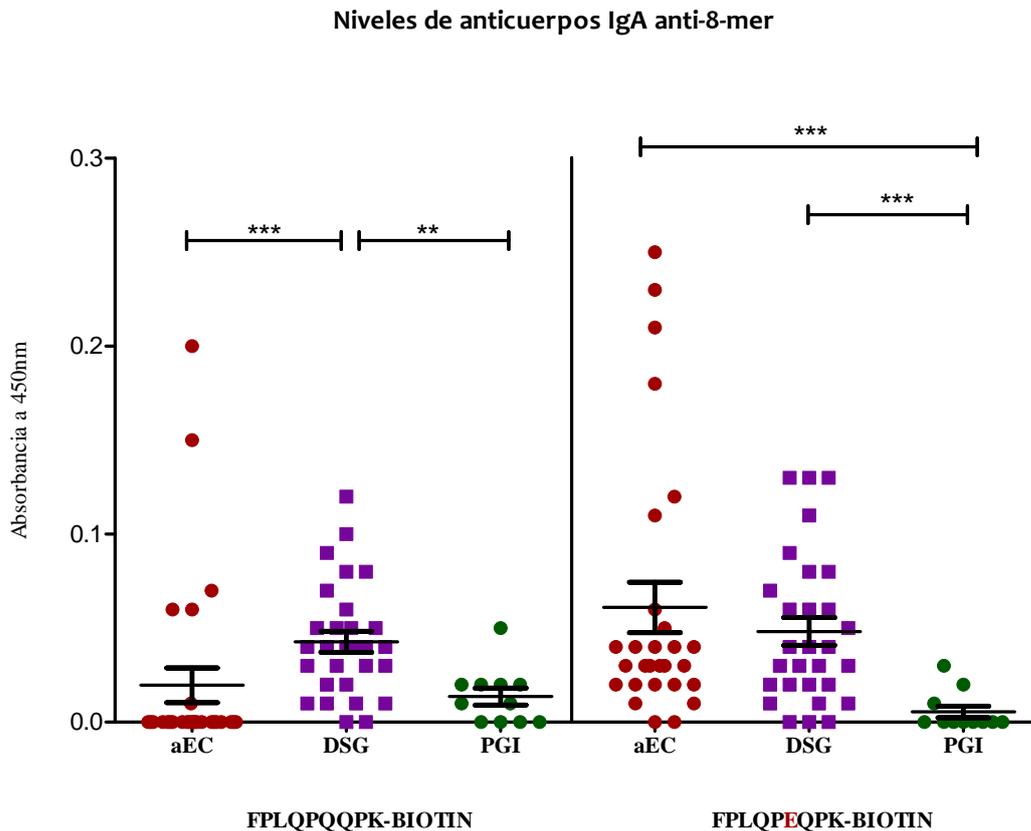


Figura 30: Niveles de anticuerpos IgA anti-8-mer detectados frente al péptido nativo y el péptido desaminado. Grupos de estudio: aEC (Celiacos en actividad), DSG (Celiacos en dieta sin gluten) y PGI (No celíacos con otra patología gastrointestinal). Cada punto representa el valor de absorbancia promedio de cada paciente. Las diferencias estadísticamente significativas están indicadas: ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

En presencia del péptido desaminado, el promedio de los niveles de absorbancia detectados en las muestras de pacientes celíacos (tanto en actividad como en dieta sin gluten) era 10 veces superior que el observado para los pacientes PGI. Además, los niveles de anticuerpos IgA anti-8mer en los pacientes celíacos disminuían ligeramente tras un tiempo en dieta sin gluten. El incremento en la reactividad de los péptidos de gliadina tras la desaminación observado en estos ensayos coincide con otros trabajos publicados en la última década [239-240].

7.4.2 Estandarización de un ensayo ELISA para la detección de anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer

El siguiente objetivo que nos planteamos fue sintetizar un polímero del péptido 8-mer que ofreciera una buena eficiencia tanto en el tapizado de la placa como en su detección por parte de los anticuerpos presentes en la muestra de suero. Para ello se diseñaron y sintetizaron un total de 10 péptidos (**Tabla 17**), compuestos por varias unidades del péptido 8-mer en tandem, combinadas con diferentes modificaciones terminales.

PÉPTIDO	SECUENCIA
PEP 1	CGG FPLQPQP GGG FPLQPQP
PEP 2	CGG FPLQPEPQ GGG FPLQPEQP GGG FPLQPEQP
PEP 3	CGG FPLQPEQP GGG FPLQPEQP
PEP 4	CGG FPLQPEQP
PEP 5	CGG QPFPQPELPFP GGG FPLQPEQP
PEP 6	CGG PEQPYQP GGG QPFPQPELPFP GGG FPLQPEQP
PEP 7	PALM-GGG FPLQPEQP
PEP 8	PALM-FPLQPEQP GGG FPLQPEQP
PEP 9	PALM-QPFPQPEQPFPQPELPFP GGG FPLQPEQP
PEP 10	Cíclico FPLQPEQP

Tabla 17: Péptidos sintéticos derivados del 8-mer diseñados y sintetizados para la estandarización del test de ELISA IgA anti-PDG 8-mer (Biomedal S.L). Secuencias de los 10 péptidos empleados en el estudio.

Para la optimización de las condiciones de fijación, se estudiaron los 10 péptidos a una concentración inicial de 5 µg/ml diluidos en tampón carbonato (15mM Na₂CO₃, 35mM NaHCO₃ y pH 9.6) y tampón fosfato (100mM de TPK, 150mM de NaCl y pH 7.4) en un volumen final de 100µl/pocillo. Se emplearon 3 muestras de plasma de adultos (2 pacientes aEC y un voluntario SANO) diluidas 1:250 en la solución de bloqueo (PBS 5% de leche en polvo). El anticuerpo secundario (IgA-HRP) se diluyó 1:1000 en la solución de bloqueo.

Como se observa en la **Figura 31**, los niveles de abosorbancia en ambos ensayos fueron aproximadamente 3 veces superiores a los obtenidos con el péptido biotinilado. En la mayoría de los casos los niveles de IgA anti-8mer detectados en los pacientes aEC fueron superiores a los observados en el individuo sano.

El incremento en el reconocimiento del péptido tras la desaminación volvió a observarse ya que el único péptido en estado nativo (PEP 1) es el que ofreció los niveles de absorbancia más bajos en ambos pacientes aEC. Es importante destacar el hecho de que los dos plasmas de estos pacientes celíacos se comportasen de manera diferente en función que el péptido llevara unido un motivo CGG o un ácido palmítico y sin embargo los niveles de IgA detectados en ambas muestras se igualaron cuando se utilizó el péptido cíclico (PEP 10). Por esta razón decidimos continuar el estudio incluyendo una muestra más de un paciente adulto aEC y descartando los péptidos 1, 3, 4 y 5 ya que fueron los que peor resultado dieron.

En la **Figura 32** se muestran los resultados obtenidos. Las muestras de plasma de los pacientes aEC presentaban niveles superiores de absorbancia cuando los péptidos se fijaron en tampón fosfato y que fué seleccionado como el tampón más adecuado. Debido a las diferencias observadas entre los dos pacientes celíacos en función del motivo de unión del péptido a la placa, decidimos fijar diferentes combinaciones de péptidos y aumentar el número de muestras de cada grupo de pacientes: 6 pacientes aEC y 4 individuos sanos.

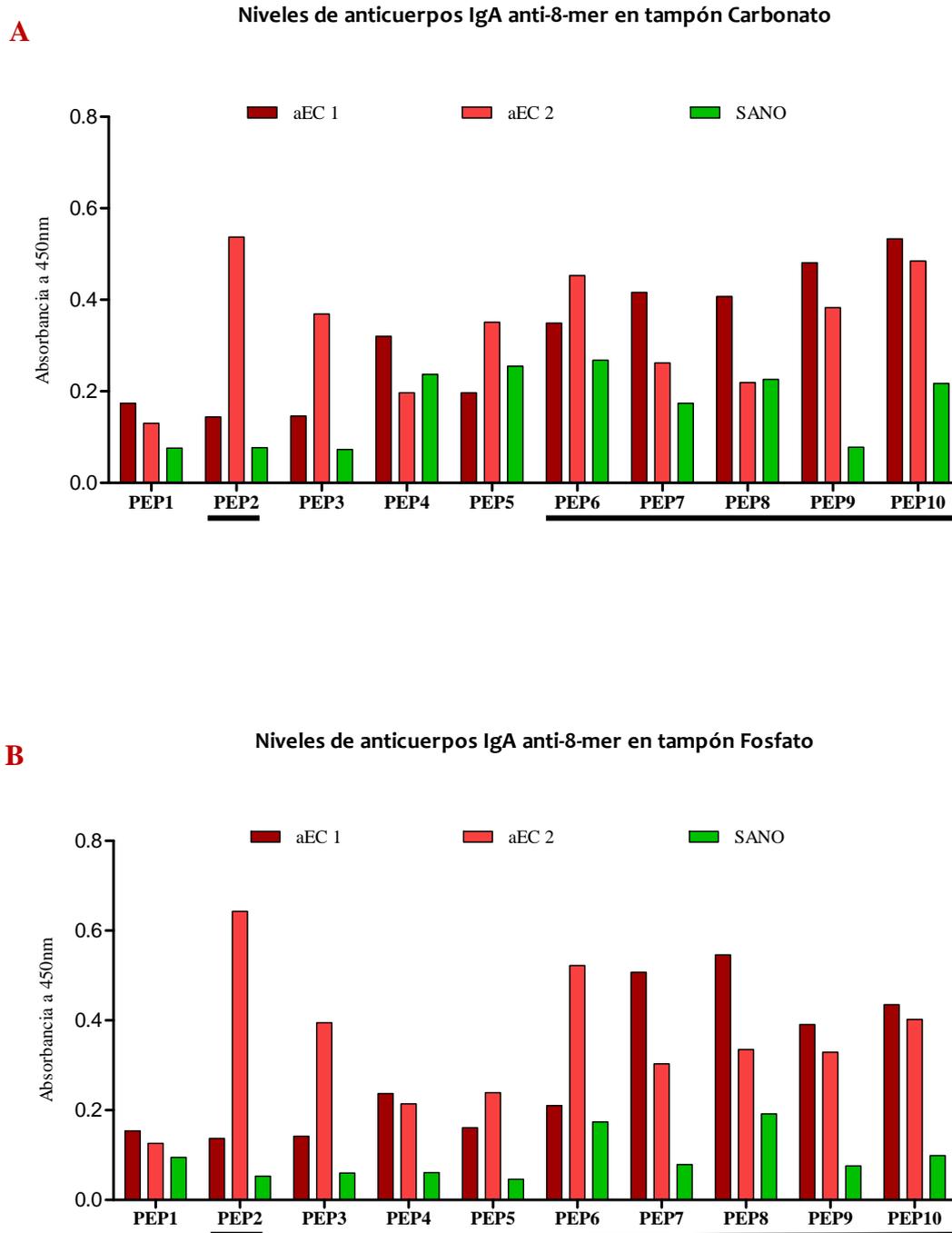
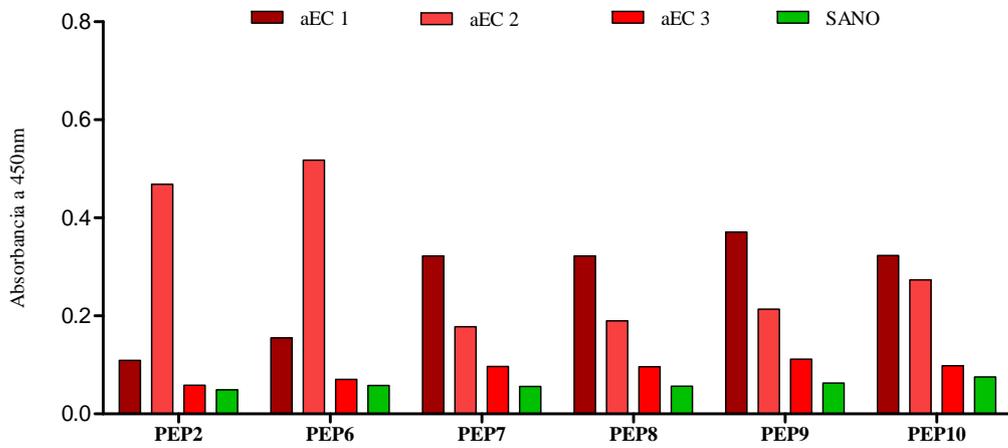


Figura 31: Niveles en plasma de anticuerpos IgA anti-8-mer detectados frente a 10 péptidos sintéticos derivados del 8-mer fijados en dos tampones diferentes. Sujetos de estudio: dos celíacos en actividad (aEC) y un voluntario sano (SANO). Cada barra representa el valor promedio para cada paciente. Los péptidos fueron fijados en tampón carbonato (A) y en tampón fosfato (B).

A

Niveles de anticuerpos IgA anti-8-mer en tampón Carbonato



B

Niveles de anticuerpos IgA anti-8-mer en tampón Fosfato

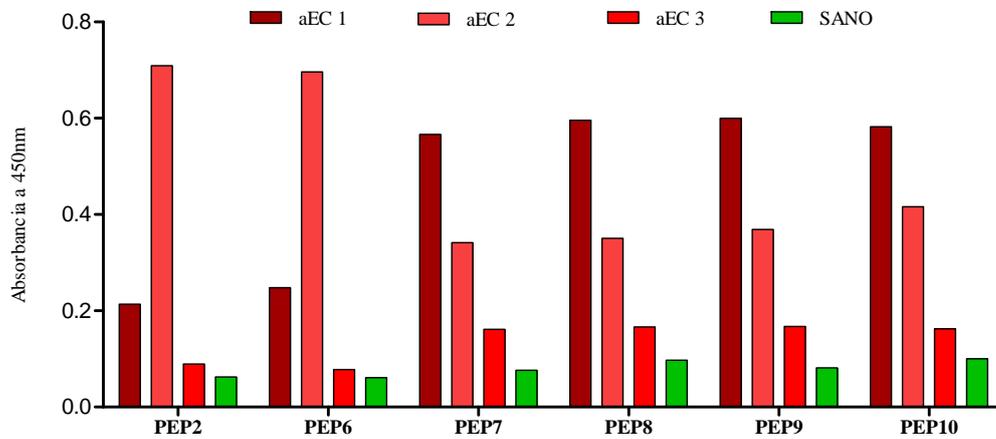


Figura 32: Niveles en plasma de anticuerpos IgA anti-8-mer frente a 6 péptidos sintéticos derivados del 8-mer fijados en dos tampones diferentes. Sujetos de estudio: tres celíacos en actividad (aEC) y un voluntario sano (SANO). Cada barra representa el valor promedio para cada paciente, estudiado en 3 ensayos separados en el tiempo. Los péptidos fueron fijados en tampón carbonato (A) y en tampón fosfato (B).

Como muestra la **Figura 33**, independientemente de la combinación de péptidos con la que se tapizó la placa, las muestras de plasma de los individuos sanos mostraron niveles de anticuerpos IgA anti-8-mer muy bajos. En cuanto a los pacientes celíacos, los mejores resultados los observamos con las tres combinaciones que incluían el péptido número 2, en concreto con la combinación del péptido 2 y el péptido 7.

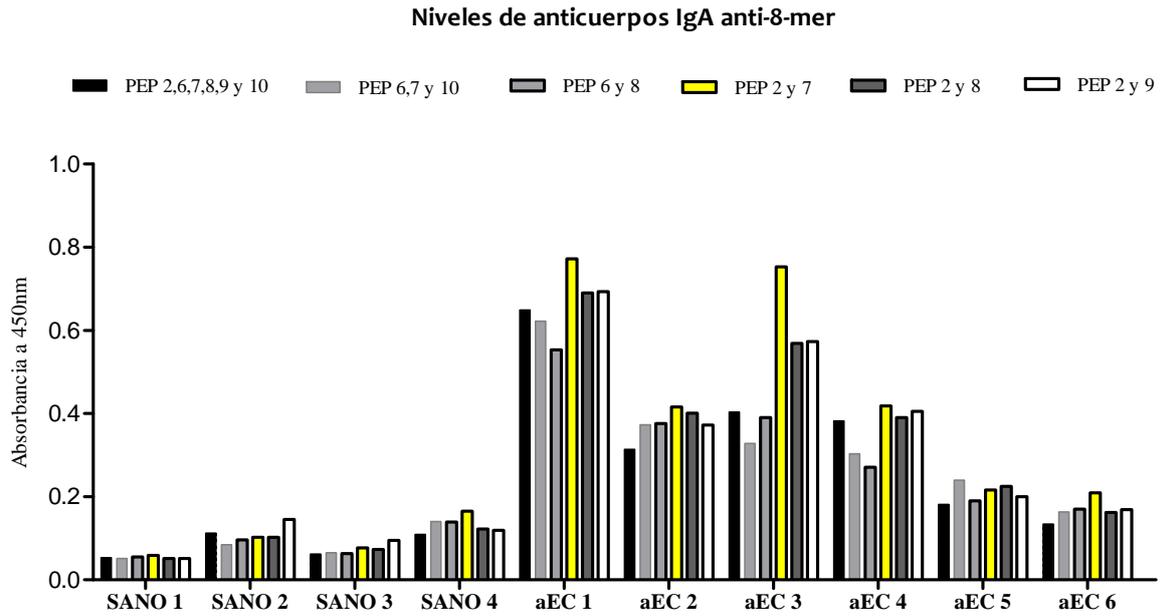


Figura 33: Niveles en plasma de anticuerpos IgA anti-8-mer frente a diferentes combinaciones de péptidos sintéticos derivados del 8-mer fijados en tampón fosfato. Sujetos de estudio: seis celíacos en actividad (aEC) y cuatro voluntarios sanos (SANO). Cada barra representa el valor promedio para cada paciente. La combinación de péptidos seleccionada como óptima está indicada en amarillo.

Finalmente, se optimizaron las proporciones de cada uno de los péptidos y su concentración final en la placa. La **Figura 34** representa los resultados obtenidos. Se seleccionó 5µg/ml en proporción 1:1 como la concentración óptima.

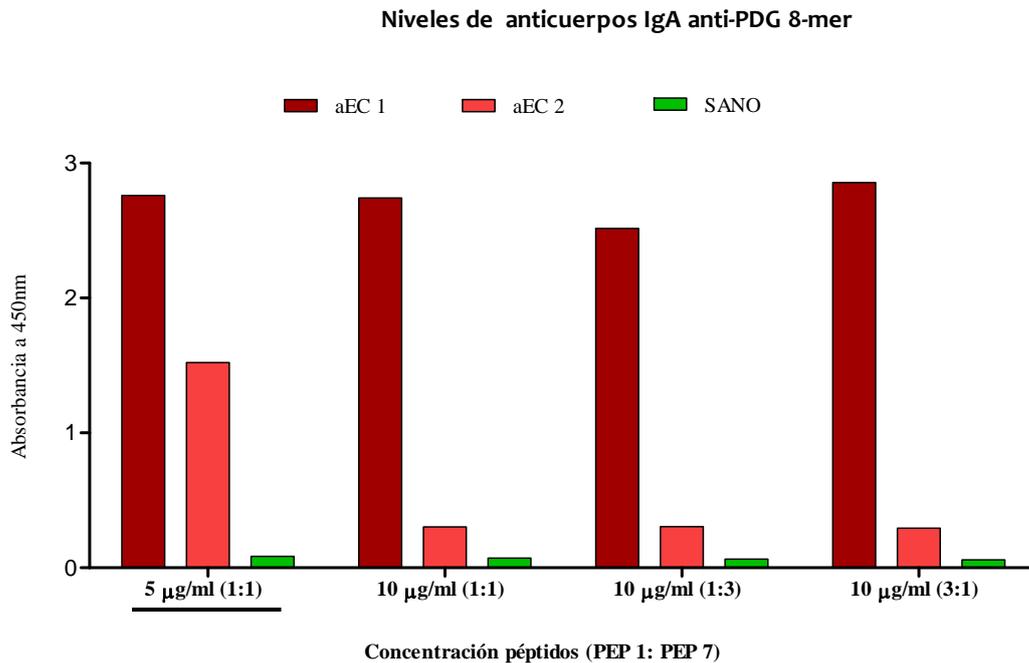


Figura 34: Niveles en plasma de anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer frente la mezcla de péptidos PEP 2+ PEP 7 fijados en tampón fosfato. Sujetos de estudio: celíacos en actividad (EC) y voluntario sano (SANO). Cada barra representa el valor promedio para cada paciente. La concentración seleccionada como óptima está subrayada en amarillo.

Inicialmente el bloqueo de las uniones inespecíficas se realizaba con una solución de PBS al 5% de BSA, y posteriormente se cambió a PBS al 5% de leche en polvo desnatada, que resultó ser más efectiva. La incubación se realizó agregando 100µl/pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente. En esta misma solución de bloqueo se realizaron las diluciones tanto de las muestras de plasma como del anticuerpo secundario.

Se optimizaron las condiciones de incubación tanto de las muestras como del anticuerpo secundario (IgA-HRP). Se estudiaron los plasmas diluidos 1:50, 1:100 y 1:200 en combinación de dos diluciones del anticuerpo secundario (1:500 y 1:1000) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

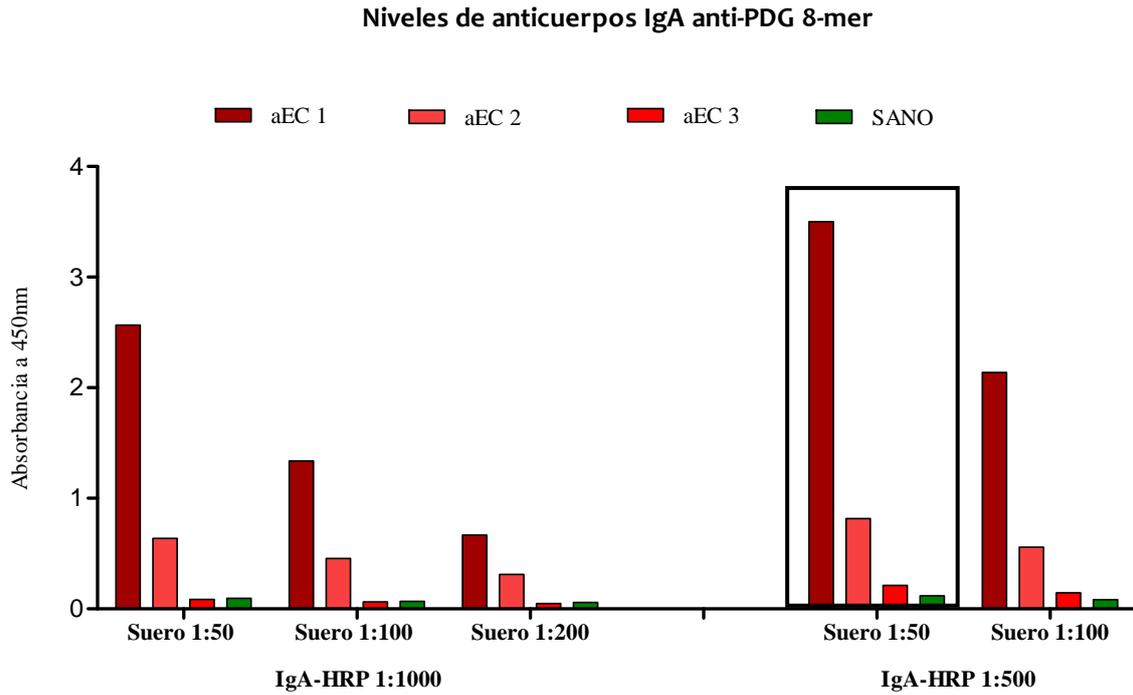


Figura 35: Niveles detectados de IgA anti-PDG 8-mer a diferentes diluciones de plasma y de anticuerpo secundario (IgA-HRP). Sujetos de estudio: celíacos en actividad (EC) y voluntario sano (SANO). Cada barra representa el valor promedio para cada paciente. La combinación de diluciones seleccionada como óptima está encuadrada en amarillo.

Como se observan en la **Figura 35**, los mejores resultados se observaron con los plasmas diluidos 1:50 y el anticuerpo secundario a 1:500, ambos en la solución de bloqueo.

Con el objetivo de realizar la incubación de las muestras a una temperatura fija, para eliminar posibles variantes que alteraran la efectividad de la unión entre el antígeno y el anticuerpo, se realizaron varios ensayos en los que la etapa de incubación de los plasmas se realizó durante una hora a 30°C y 37°C, cuyos resultados (**Figura 36**) fueron comparados con los obtenidos a temperatura ambiente, bien durante 1 hora (condiciones estándar) o durante 3 horas.

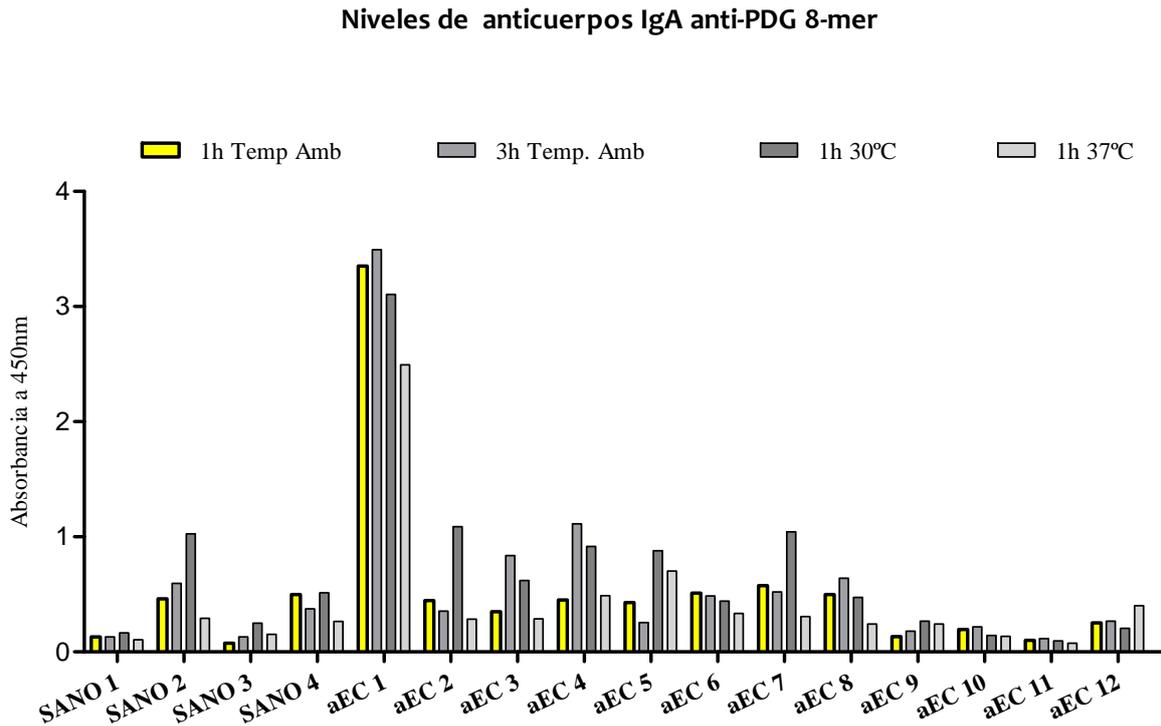


Figura 36: Niveles de IgA anti-8mer detectados en muestras de plasma, a diferentes condiciones de incubación. Grupos de estudio: celíacos en actividad (EC) y voluntarios sanos (SANO). Cada barra representa el valor promedio para cada paciente. Las condiciones de incubación seleccionadas como óptimas están indicadas en amarillo.

Al aumentar el tiempo de incubación o fijar la temperatura a 30°C o 37°C, en la mayoría de las muestras de pacientes aEC los niveles de absorbancia detectados aumentaban con respecto a la incubación de 1h a temperatura ambiente, sin embargo todas ellas fueron descartadas ya que también incrementaban los niveles de absorbancia en las muestras de los individuos sanos.

A lo largo de la estandarización también fue necesario optimizar el sustrato de la enzima peroxidasa de rábano: el reactivo tetrametilbencidina (TMB), para lo que se probaron 3 sustratos TMB de 3 casas comerciales diferentes:

- a) **TMB QUICK for ELISA, Liquid Substrate, Acros Organics:** 100µl/pocillo, incubar 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad y detener la reacción agregando sobre el TMB 100µl de H₂SO₄ 0.1M.
- b) **TMB Liquid Substrate, Sigma-Aldrich:** 200µl/pocillo, incubar 45-50 minutos a temperatura ambiente y oscuridad y detener la reacción agregando sobre el TMB 100µl

de H₂SO₄ 0.5M

c) TMB One Component HRP Microwell Substrate, BioFX, SurModics: 100µl/pocillo, incubar 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad y detener la reacción agregando sobre el TMB 100µl de H₂SO₄ 0.3M.

El TMB de SurModics ofreció los mejores resultados y fue el seleccionado para el ELISA IgA anti-8mer. Para la lectura de la placa, en todos los casos se detenía la reacción agregando H₂SO₄ directamente sobre el TMB. Cuando el TMB reacciona con la enzima HRP, éste se tiñe de azul, y cambia a amarillo al agregar el sulfúrico. Decidimos hacer la lectura de absorbancia tras detener la reacción para que los valores fueran más estables. La lectura se realizó a una longitud de onda de 450nm , utilizando el lector : UVM340, Asys Hitech GmbH, (Eugendorf, Austria), y utilizando el programa Omega Control.

Para comprobar que el ELISA IgA anti-PDG 8-mer diseñado y optimizado en este trabajo ofrecía unos resultados estables y reproducibles en el tiempo se realizó el mismo ensayo tres veces por semana a lo largo de un mes, en el que se analizaron los niveles de anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer en una muestra de plasma de un paciente adulto aEC y de un adulto sano. La estabilidad y repetitividad interensayo se muestran en la **Figura 37**.

Estabilidad y repetitividad del ELISA IgA anti-PDG 8-mer

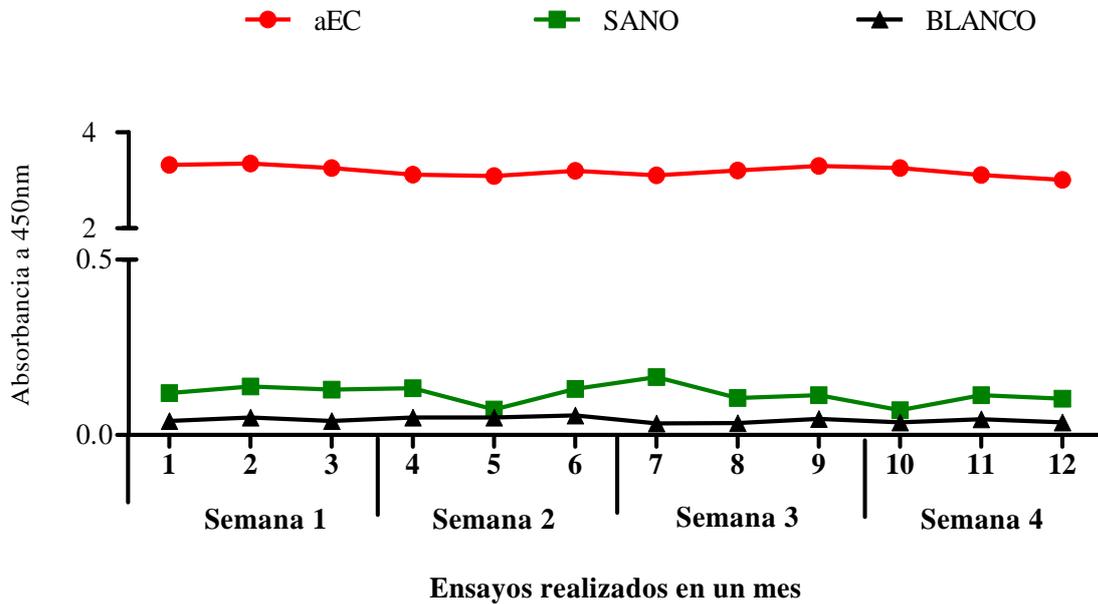


Figura 37: Estudio de la estabilidad y repetitividad del ELISA IgA anti-PDG 8-mer en el tiempo. En la gráfica se representan los resultados obtenidos para el mismo ensayo repetido durante un mes a razón de 3 ensayos por semana. Sujetos de estudio: paciente celiaco (aEC), voluntario sano (SANO) y control blanco de la técnica (BLANCO).

Cada uno de los test ELISA realizados en este trabajo y con los cuales se han obtenido los resultados que se muestran a continuación, fueron estructurados de la siguiente manera: en cada placa se incluyó una muestra control positiva (paciente aEC), una muestra control negativa (voluntario SANO), y un blanco. Todas las muestras fueron estudiadas por triplicado, y el valor que se representa en las gráficas es el promedio de cada una de ellas.

El valor de corte de absorbancia fue calculado para cada grupo de edad utilizando los resultados obtenidos para la población de pacientes PGI (media \pm 2 x desviación estándar) con el objetivo de discriminar, con la mayor especificidad posible, entre este grupo de pacientes y los pacientes celiacos en actividad (aEC). Solamente las muestras cuyo valor de absorbancia era mayor o igual que el valor de corte fueron consideradas positivas. Para el análisis estadístico se utilizó el test t Student's con datos no pareados y las diferencias con $p < 0.05$ fueron consideradas estadísticamente significativas. Para

cada grupo de edad se calculó la especificidad $[(\text{verdaderos negativos}/(\text{verdaderos negativos} + \text{falsos positivos})) \times 100]$ y la sensibilidad $[(\text{verdaderos positivos} / (\text{verdaderos positivos} + \text{falsos negativos})) \times 100]$ del ensayo.

7.4.3 Detección de anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer en muestras de plasma de pacientes celíacos adultos.

Debido a las diferencias que existen, tanto en las manifestaciones clínicas como en el diagnóstico, entre pacientes celíacos pediátricos y adultos, a la hora de estudiar alguno de los marcadores serológicos característicos de la EC, es importante evaluar los resultados en función de la edad del paciente. En adultos, los síntomas gastrointestinales característicos de la EC normalmente van acompañados de otras manifestaciones y patologías como cirrosis, enfermedad inflamatoria intestinal y diabetes mellitus [241-245], responsables en muchos casos de falsos positivos en las pruebas serológicas las cuales presentan una sensibilidad y especificidad inferiores en adultos que en niños.

Por esta razón el ensayo ELISA IgA anti-PDG 8-mer fue optimizado utilizando muestras de plasma de pacientes adultos, y para comprobar si la sensibilidad y especificidad conseguida era comparable con la de otros marcadores, se estudió la presencia de anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer en : 16 pacientes aEC, 12 pacientes DSG, 27 voluntarios sanos y 46 pacientes PGI.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 38**. Los valores medios de absorbancia a 450nm de D.O obtenidos para cada grupo de edad fueron (media \pm SEM): 1.19 ± 0.28 en pacientes aEC, 0.31 ± 0.03 en pacientes DSG, 0.17 ± 0.01 en SANOS y 0.26 ± 0.01 en pacientes PGI. De acuerdo al valor de corte obtenido para la población adulta (0.5), 13 de los 16 pacientes aEC estudiados fueron positivos y todos los pacientes DSG excepto uno fueron negativos para los anticuerpos IgA anti-8mer. En ninguno de los pacientes PGI y controles SANOS incluidos se detectaron niveles de anticuerpos IgA anti-8mer.

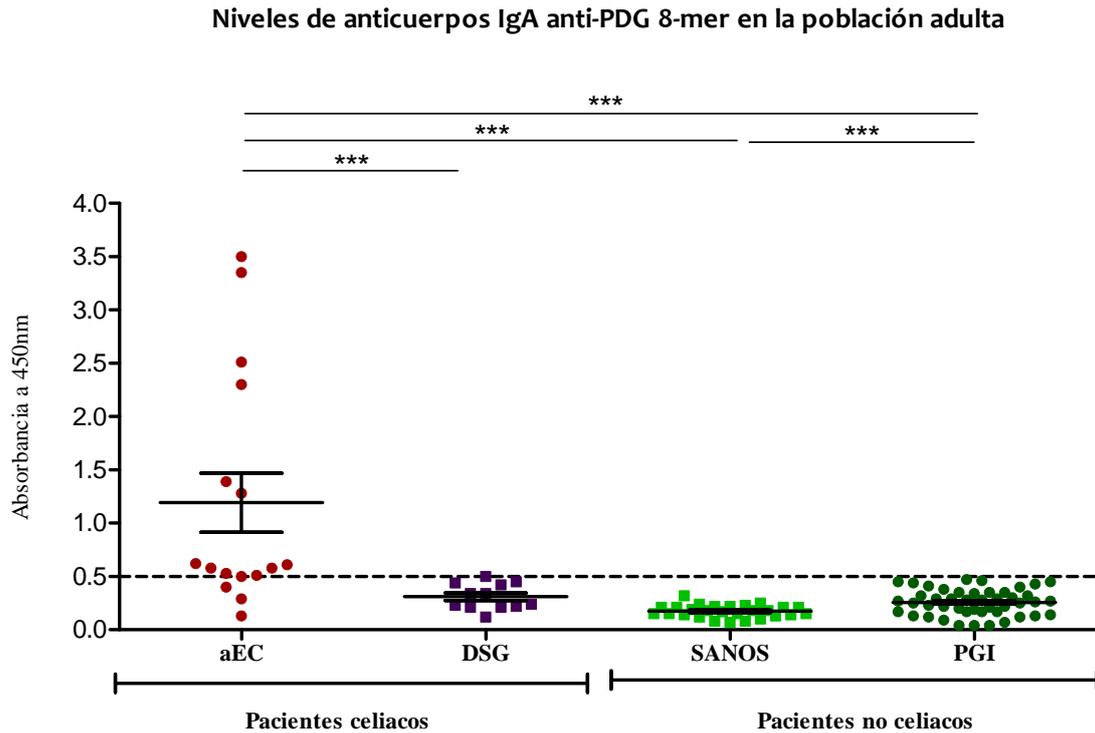


Figura 38: Niveles en plasma de anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer en la población adulta. Grupos de estudio: celíacos en actividad (aEC), celíacos en dieta sin gluten (DSG), controles sanos (SANOS) y pacientes no celíacos con otra patología gastrointestinal (PGI). Cada punto representa el valor medio de absorbancia a una densidad óptica de 450nm para un paciente. De acuerdo al valor de corte calculado para la población infantil (0.5, indicada con una línea de puntos), los pacientes con un valor de absorbancia superior a 0.21 fueron considerados positivos para los anticuerpos IgA anti-8mer (75 % de aEC) y aquellos con niveles de absorbancia inferiores se consideraron negativos (18.7 % de aEC, 100 % de DSG, SANOS y PGI). *** $p < 0.001$.

Cuando comparamos los valores medios obtenidos entre las diferentes poblaciones observamos que existían diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes aEC y el resto de los grupos incluidos. Todas las muestras de pacientes PGI estudiadas fueron negativas para los anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer y sin embargo, algunos de ellos eran positivos para los anticuerpos IgA anti-TG. La especificidad del test en la población adulta fue del 100%.

7.4.4 Detección de anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer en muestras de plasma de pacientes celíacos infantiles.

Con el objetivo de estudiar la presencia de anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer en la población infantil, se incluyeron en el estudio el siguiente número de pacientes: 31 pacientes aEC, 17 pacientes DSG, 10 individuos sanos y 23 pacientes PGI.

Los resultados se muestran en la **Figura 39**. Los valores de absorbancia (media \pm SEM) a una densidad óptica de 450nm obtenidos para cada grupo de estudio fueron: 1.61 ± 0.24 para los pacientes aEC, 0.14 ± 0.02 en los pacientes DSG, 0.06 ± 0.003 en los individuos SANOS y 0.10 ± 0.01 en los pacientes PGI.

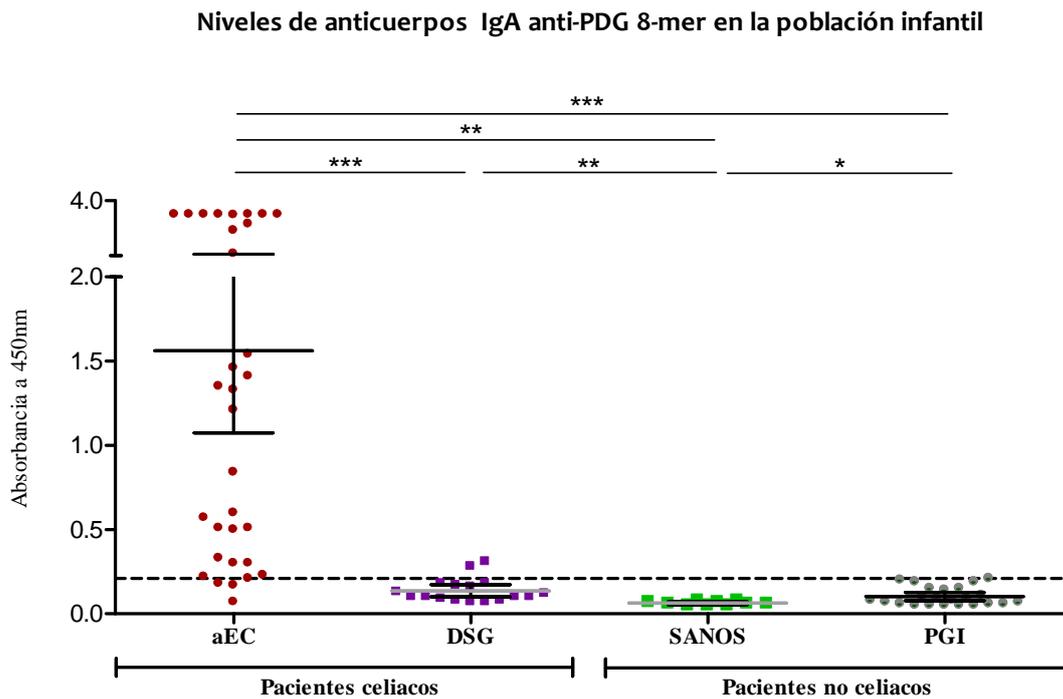


Figura 39: Niveles en plasma de anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer en la población infantil. Grupos de estudio: celíacos en actividad (aEC), celíacos en dieta sin gluten (DSG), controles sanos (SANOS) y pacientes no celíacos con otra patología gastrointestinal (PGI). Cada punto representa el valor medio de absorbancia a una densidad óptica de 450nm para un paciente. De acuerdo al valor de corte calculado para la población infantil (0.21, indicada con una línea de puntos), los pacientes con un valor de absorbancia superior a 0.21 fueron considerados positivos para los anticuerpos IgA anti-8mer (90.6% de aEC, 10.5% de DSG y 4.3% de PGI) y aquellos con niveles de absorbancia inferiores se consideraron negativos (9.4% de aEC, 89.5% de DSG, 100% de SANOS y 95.7% de PGI). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

De acuerdo al valor de corte calculado para la población pediátrica (0.21), entre los pacientes aEC (n=31) se detectaron 29 positivos y 2 negativos para los anticuerpos IgA anti-8mer. En el caso de los pacientes DSG (n=17) solamente 2 niños presentaban niveles positivos de anticuerpos IgA anti-8mer. En uno de los 23 pacientes PGI se consideró positivo en el ensayo por presentar niveles ligeramente superiores al valor de corte, mientras que los restantes 22 niños presentaban niveles negativos de anticuerpos IgA anti-8mer.

Analizamos un total de 31 niños con enfermedad celiaca activa (aEC) de los cuales 29 presentaron niveles detectables de anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer y solamente 2 de ellos se consideraron negativos (pacientes aEC-30 y aEC-31 en la **Tabla 18**). Una posible explicación para uno de estos casos (aEC-31) es que se trataba de un niño con una hermana celiaca y podría ser que en el momento en que se le tomó la muestra, realizara una dieta parcialmente libre de gluten como suele ocurrir en la mayoría de las familias donde uno de los miembros tiene el diagnóstico de la enfermedad. De los 17 niños celiacos en dieta sin gluten (DSG) incluidos en el estudio, solamente dos de ellos resultaron positivos para el ensayo (**Tabla 19**). Uno de ellos (DSG-1) resultó ser un paciente que no respondía bien a la dieta y que además sufría diarrea prolongada. Lo interesante de este paciente es que, a pesar de no responder a la DSG, presentaba niveles de IgA anti-TGt negativos. El otro niño DSG con niveles detectables de IgA anti-PDG 8-mer (DSG-2) presentaba niveles de IgA anti-TGt una unidad por encima del valor de corte para este marcador, y 6 meses después, en una revisión médica, los niveles de estos anticuerpos ya se habían normalizado.

Es interesante destacar que 10 de los 17 niños en DSG presentaban niveles positivos de anticuerpos IgA anti-TG, a pesar de estar ya en dieta y de tener mejora clínica y, sin embargo, todos ellos fueron negativos para los anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer lo que sugiere la posibilidad de utilizar estos anticuerpos como marcadores de la adherencia de los pacientes a la DSG. Sería necesario realizar estudios que lo confirmaran, como un seguimiento de los pacientes y una comparación directa con los niveles de anticuerpos IgA anti-TG y con detección de péptidos de gluten en heces [206]. Aunque los anticuerpos IgA anti-TG han sido propuestos como marcadores de la adherencia a la DSG, su efectividad no está del todo clara ya que han sido clasificados como buenos [246] y malos [247] marcadores de las transgresiones de la dieta.

Muestra	Sexo	Edad	HLA DQ2/DQ8	IgA anti-TGt	IgA anti-PDG 8-mer	Atrofia (Marsh)
aEC-1	H	2	+	+	+	III
aEC-2	M	2	+	+	+	III
aEC-3	M	3	+	+	+	III
aEC-4	M	1	+	+	+	III
aEC-5	H	1	+	+	+	II
aEC-6	M	3	+	+	+	III
aEC-7	H	1	+	+	+	N.D
aEC-8	M	2	+	+	+	N.D
aEC-9	M	3	+	+	+	III
aEC-10	H	2	+	+	+	III
aEC-11	H	2	+	+	+	III
aEC-12	M	2	+	+	+	N.M
aEC-13	M	3	+	+	+	III
aEC-14	M	6	+	+	+	III
aEC-15	M	1	+	+	+	N.D
aEC-16	M	2	+	+	+	III
aEC-17	M	9	+	+	+	III
aEC-18	M	2	+	+	+	III
aEC-19	H	8	+	+	+	N.D
aEC-20	M	2	+	+	+	N.D
aEC-21	H	3	+	+	+	III
aEC-22	M	2	+	+	+	III
aEC-23	M	3	+	+	+	III
aEC-24	M	3	+	+	+	III
aEC-25	M	2	+	+	+	III
aEC-26	M	10	+	+	+	III
aEC-27	M	10	+	+	+	I
aEC-28	M	1	+	+	+	III
aEC-29	H	11	+	+	+	III
aEC-30	H	1	+	+	-	III
aEC-31	M	9	+	+	-	III

Tabla 18: Datos clínicos de los niños celíacos en actividad (aEC) incluidos en este estudio. En la tabla se muestra el género y la edad de cada paciente, además de los marcadores genéticos, marcadores serológicos (anticuerpos IgA anti-TGt e IgA anti-PDG 8-mer) y el grado de atrofia intestinal en la escala de Marsh (N.D: no determinada).

Muestra	Sexo	Edad	HLA DQ2/DQ8	IgA anti-TGt	IgA anti-PDG 8-mer	Atrofia (Marsh)	Meses en DSG
DSG-1	M	10	+	-	+	III	N.R
DSG-2	M	7	+	+	+	III	4
DSG-3	M	6	+	-	-	III	4
DSG-4	M	2	+	+	-	N.D	1.5
DSG-5	H	4	+	+	-	III	3
DSG-6	M	2	+	-	-	N.D	6
DSG-7	M	3	+	+	-	III	3
DSG-8	H	4	+	+	-	III	4
DSG-9	M	2	+	-	-	N.D	10
DSG-10	M	2	+	-	-	N.D	6
DSG-11	H	5	+	+	-	III	3
DSG-12	H	2	+	-	-	III	2
DSG-13	M	3	+	+	-	II	3
DSG-14	H	1	+	+	-	III	12
DSG-15	H	12	+	+	-	N.D	5
DSG-16	M	11	+	+	-	N.D	7
DSG-17	H	2	+	+	-	N.D	1

Tabla 19: Datos clínicos de los niños celíacos en dieta sin gluten (DSG) incluidos en este estudio. En la tabla se muestra el género y la edad de cada paciente, además de los marcadores genéticos, marcadores serológicos (anticuerpos IgA anti-TGt e IgA anti-PDG 8-mer), el grado de atrofia intestinal en la escala de Marsh (N.D: no determinada) y el tiempo (en meses) que lleva en dieta sin gluten.

La normalización de los niveles de IgA anti-TG ocurre normalmente tras 6 meses en DSG, y en nuestro estudio, los anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer no se detectaron en un niño que llevaba únicamente 1 mes en DSG mientras que sus niveles de IgA anti-TG eran positivos. De acuerdo con esto, Comino et al [206] estimaron que el tiempo de excreción de los péptidos tóxicos de gluten en las heces era entre 2 y 6 días, y además, la vida biológica de los anticuerpos IgA en plasma está calculada entre 5.9 y 4.5 días para las subclases IgA1 e IgA2 respectivamente [248].

La especificidad del ensayo es el parámetro crítico para discriminar entre los pacientes celíacos de aquellos que presentan otra patología gastrointestinal, mientras que la sensibilidad es crucial en la búsqueda de nuevos pacientes. De entre los 23 pacientes PGI estudiados, solamente un niño, cuya madre tenía diagnosticada la EC, presentó niveles positivos de IgA anti-PDG 8-mer. En un trabajo publicado en el año

2012 por la ESPGHAN [249] y en otros estudios de detección de anticuerpos frente a péptidos desaminados derivados de la gliadina (PDG) [250-251] se ha establecido el intervalo de especificidad de estos anticuerpos en 86.3-93.1% y la sensibilidad en 80.7-85.1%.

El valor máximo de absorbancia observado en la población infantil (Figura 16) fueron casi 4 veces superior a aquel observado en los adultos (Figura 17). Sin embargo, los anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer podrían aportar un grado adicional de especificidad en ambas poblaciones si se comparan con otros marcadores serológicos debido a varias razones. En primer lugar, la enzima transglutaminasa tisular se expresa de forma constitutiva en todos los individuos [252] debido a su importante papel en la apoptosis y diferenciación celular y por lo tanto los anticuerpos IgA anti-TG pueden persistir elevados debido a la inflamación provocada por cualquier patología e incluso en pacientes celíacos que siguen una correcta DSG. En segundo lugar, los anticuerpos anti-PDG normalmente son derivados de gluten digerido con enzimas comerciales como pepsina, tripsina, quimotripsina, elastasa y carboxipeptidasa y posteriormente modificados con la enzima TG2 [237]. El péptido 8-mer, al ser generado durante la digestión del gluten por proteasas específicas de los pacientes celíacos, los anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer aportan un mayor grado de especificidad.

7.4.5 Ausencia de anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer en muestras de plasma de pacientes adultos con Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

Los resultados obtenidos en la población adulta, junto con el hecho de en adultos son cada vez más frecuentes las formas atípicas de presentación de la EC y las características sintomatológicas que comparte con la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII), decidimos incluir en el estudio un grupo de 34 adultos con Colitis Ulcerosa (C.U) y otro de 43 adultos con Enfermedad de Crohn (E. Crohn).

Se observaron niveles anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer superiores al valor de corte establecido para la población adulta en 2 pacientes con C. U y 3 pacientes con E.Crohn (**Figura 40-A**), aunque las diferencias entre ambos grupos de estudio no resultaron estadísticamente significativas. Todos los pacientes con EII incluidos en el estudio presentaban un diagnóstico confirmado o de C.U o de E. Crohn. El hecho de

que, según nos informaron los respectivos gastroenterólogos, ninguno de estos pacientes tuviera alguna característica que les diferenciara del resto del grupo y que pudiera ser determinante a la hora de evaluar sus niveles de anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer, decidimos analizar en todos ellos el marcador de susceptibilidad genética HLA-DQ2 y los niveles en plasma de anticuerpos IgA anti-TGt.

En la **Figura 40-B** se representan los niveles detectados de anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer en función de la predisposición genética de los pacientes a desarrollar la EC, de manera que los pacientes se clasificaron en 3 grupos en función de si expresaban los dos alelos de la molécula HLA-DQ2 (DQA y DQB): pacientes HLA-DQ2 negativos, pacientes HLA-DQA o DQB positivos y pacientes HLA-DQ2 positivos.

El primer dato interesante que observamos tras el estudio de los marcadores genéticos de la EC en los pacientes con EII fue el elevado porcentaje de pacientes que presentaban al menos uno de los dos alelos de riesgo: el 19.5% de los pacientes expresaban el heterodímero HLA-DQ2 completo, el 36.4% expresaban uno de los alelos del heterodímero DQ2 (DQA o DQB), y el 44.1% eran HLA-DQ2 negativos. De los dos marcadores genéticos de la EC (DQ2 y DQ8) solamente estudiamos uno de ellos, por lo tanto, cabría la posibilidad de que el porcentaje de pacientes EII sin riesgo genético a sufrir la enfermedad celiaca podría ser aún menor. Los cinco pacientes con niveles positivos de anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer expresaban únicamente uno de los dos alelos del heterodímero DQ2.

En la **Figura 41** se representan los niveles de anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer y anticuerpos IgA anti-TGt para cada uno de los pacientes EII incluidos en el estudio. Solamente 4 de los 77 pacientes con EII presentaban niveles positivos de anticuerpos IgA anti-TGt (> 200 U/ml). Teniendo en cuenta que la enorme diferencia entre las unidades de medida de ambos tipos de anticuerpos, decidimos ajustar los niveles de IgA anti-TGt de manera que se consideró 4 como el valor de corte, de manera que aquellos con más de 200U/ml, superaban el valor de 4 en anticuerpos IgA anti-TGt.

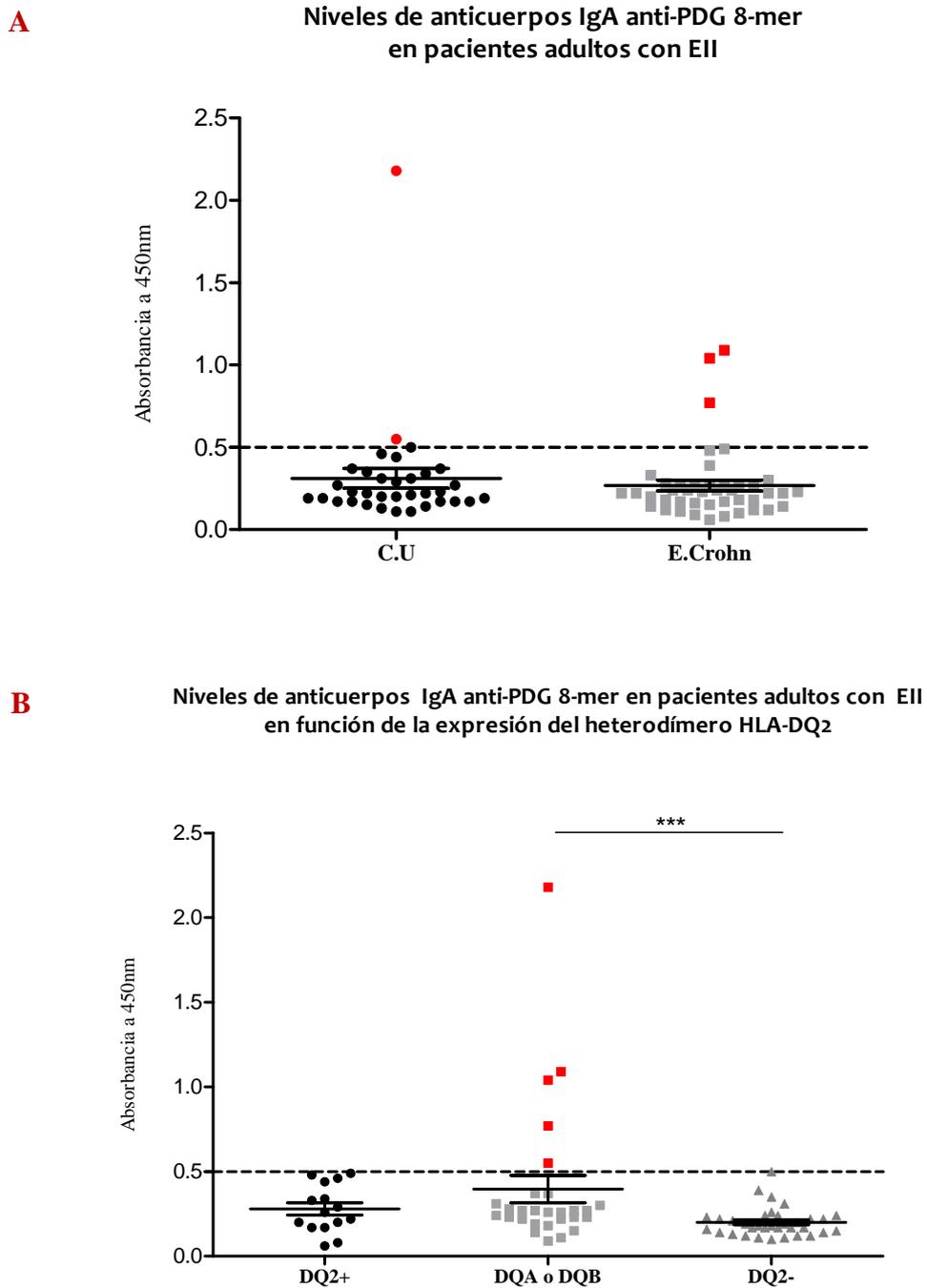


Figura 40: Niveles en plasma de anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer en pacientes adultos con Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Grupos de estudio: Colitis Ulcerosa (C:U) y Enfermedad de Crohn (E.Crohn). En **(A)** valores de absorbancia obtenidos para cada grupo de estudio. Cada punto representa el valor medio de un paciente a una D.O de 450nm. De acuerdo al valor de corte para la población adulta (0.5, línea de puntos),mls pacientes con un valor de absorbancia superior a 0.5 se consideraron positivos (8.82% de CU y 6.97% de E.Crohn) y aquellos con niveles de absorbancia inferiores se consideraron negativos (91.2% de CU y 93% de E.Crohn). En **(B)** se representan los resultados de cada paciente en función de su carga genética: HLA-DQ2+, HLA-DQA+ o HLA-DQB+ y HLA-DQ2-. Diferencias estadísticamente significativas *** $p < 0.001$

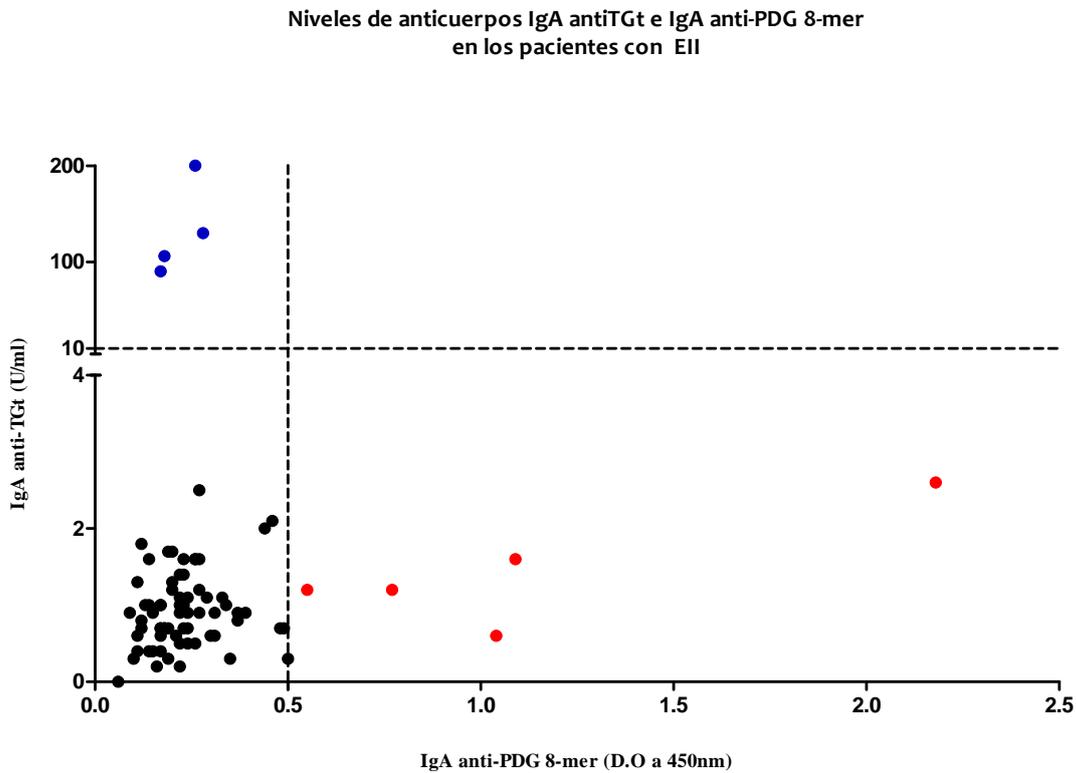


Figura 41: Niveles de anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer y anticuerpos IgA anti-TGt en pacientes adultos con EII. Grupos de estudio: Colitis Ulcerosa (C.U) y Enfermedad de Crohn (E.Crohn). De cada uno de los pacientes incluidos se analizaron los niveles de ambos tipos de anticuerpos IgA de manera que cada punto representa los niveles de anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer (en el eje Y) y los niveles de IgA anti-TGt (en el eje X). El valor de corte para los anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer es de 0.5 (línea de puntos en el eje Y). Los niveles de anticuerpos IgA anti-TGt se consideran positivos cuando son mayores o iguales a 200U/ml, a los cuales se les asigna el valor 4 para ajustar la gráfica.

No se observó ningún tipo de relación entre ambos marcadores serológicos, ya que ninguno de los pacientes presentaba niveles positivos de los dos tipos de anticuerpos estudiados. Tampoco parecía haber una relación directa entre la carga genética y los niveles positivos de anticuerpos IgA anti-TGt, ya que uno de los pacientes con niveles positivos era HLA-DQ2 negativo (**Tabla 20**). En estos 5 pacientes se determinó la presencia de anticuerpos IgA anti-endomisio, siendo todos ellos negativos. Teniendo en cuenta la información clínica cedida de los pacientes EII incluidos en este trabajo, consideramos que una posible explicación a la detección de

anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer en el 6,5% de la población EII estudiada es que sería necesario completar el estudio de la predisposición genética de estos pacientes a desarrollar la EC con el análisis de expresión de la molécula HLA-DQ8, y en caso de que dieran positivo, quizás se podría hablar EC asintomática.

DQA	DQB	IgA anti-PDG 8-mer	IgA anti-TGt	n (EII)
+	+	-	-	15
+	-	+	-	3
+	-	-	+	2
+	-	-	-	8
-	+	+	-	2
-	+	-	+	1
-	+	-	-	12
-	-	-	+	1
-	-	-	-	33
				77

Tabla 20: Resultados del estudio del marcador genético (HLA-DQ2), marcador serológico (IgA anti-TGt) y anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer en un total de 77 pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal. En la tabla se muestra la positividad o negatividad de cada uno de los marcadores estudiados, y el número de pacientes EII que presenta cada tipo de combinación de marcadores.

La probabilidad de que un paciente con EC desarrolle o padezca una EII concomitante es 10 veces más alta que en la población general [185, 253], especialmente para la colitis ulcerosa (C.U). A su vez, la C.U es 5 veces más frecuente entre los familiares de un paciente con EC [254]. Ambas enfermedades comparten un polimorfismo del gen receptor de la IL-23 que condiciona un estado proinflamatorio. Por el contrario, la prevalencia de EC entre los pacientes con EII no parece más elevada que la observada en la población general.

Los anticuerpos anti-TGt son muy sensibles en el diagnóstico de la EC, sin embargo, varios estudios han reseñado la existencia de resultados falso positivos con relativa frecuencia. Estos anticuerpos han sido identificados en pacientes con EII, sugiriendo una baja especificidad de los anticuerpos anti-TGt como marcadores serológicos de la EC. La detección de estos anticuerpos ha sido atribuida a las lesiones intestinales y a la actividad inflamatoria característica de los pacientes con EII. La TGt juega un papel importante y complejo en la apoptosis [255-256], y se ha demostrado

tanto in vivo como in vitro que las células apoptóticas inducen y activan la expresión de la TGt [187].

7.4.6 Detección de anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer en muestras de jugo duodenal de pacientes celíacos adultos.

En los pacientes celíacos, tras la ingesta de gluten, se desencadena una respuesta inmune humoral tras el reconocimiento de los péptidos derivados de la digestión del gluten como antígenos. Además, una de las posibles vías de entrada de los péptidos tóxicos hacia la lámina propia del intestino es el transporte por retrotranscitosis mediada por los anticuerpos IgA [132]. Por esta razón nos planteamos la posibilidad de detectar anticuerpos IgA frente al péptido 8-mer en muestras de jugo duodenal de individuos adultos.

Se estudiaron un total de 17 muestras de adultos, 10 pacientes aEC, 3 pacientes DSG y 4 pacientes PGI. Para realizar este estudio fue necesario ajustar alguna de las etapas del protocolo del ELISA IgA anti-PDG 8-mer estandarizado para los estudios en muestras de plasma.

En el primer ensayo (**Figura 42**) el protocolo seguido fue el mismo, salvo que en este caso las muestras se incubaron sin diluir porque el propio jugo duodenal ya está diluido en PBS. Disponíamos de un volumen de muestra bastante limitado, lo que nos llevó a agregar la mínima cantidad posible: 25µl/pocillo.

Dado que al menos una de las muestras presentaba niveles bastante altos de absorbancia, decidimos realizar una curva de diluciones seriadas con la muestra del paciente aEC1 para determinar el nivel de detección de la técnica y comprobar que la absorbancia detectada en esta muestra no fuera un artefacto (**Figura 43**), y el resto de muestras incubarlas sin diluir. Tanto las diluciones de la muestra como del anticuerpo secundario se hicieron en PBS en lugar de solución de bloqueo, ya que era el tampón en el que recibíamos la muestra de jugo duodenal.

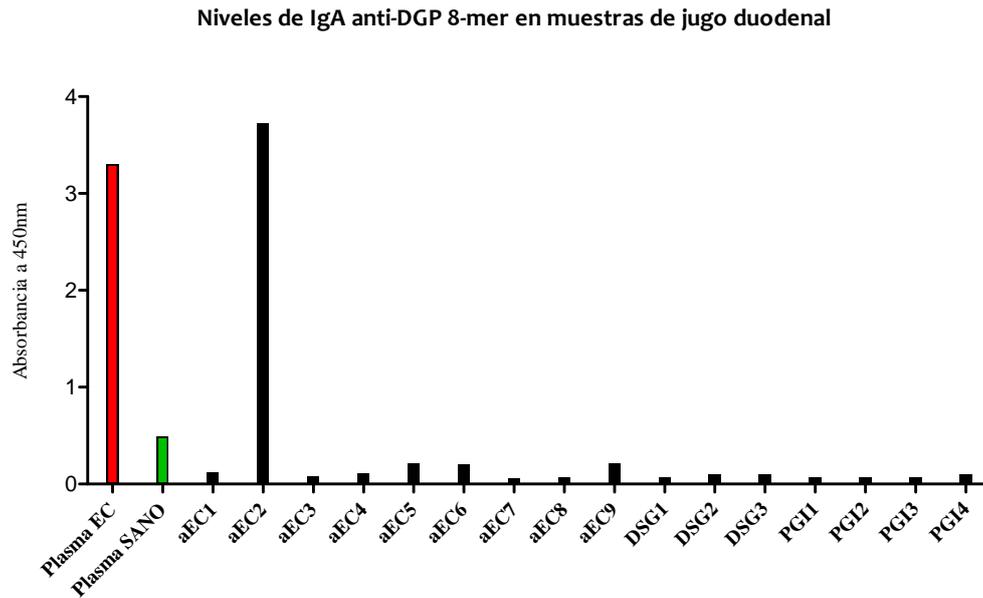


Figura 42: Niveles de anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer en jugo duodenal de pacientes adultos. Grupos de estudio: celíacos en actividad (aEC), celíacos en dieta sin gluten (DSG) y pacientes no celíacos con otra patología gastrointestinal (PGI). Cada barra representa el valor medio de absorbancia para un paciente. Se incluyeron dos muestras de plasma control (rojo: plasma de paciente aEC, verde: plasma de individuo SANO). El valor de corte (0.5) se indica con una línea de puntos.

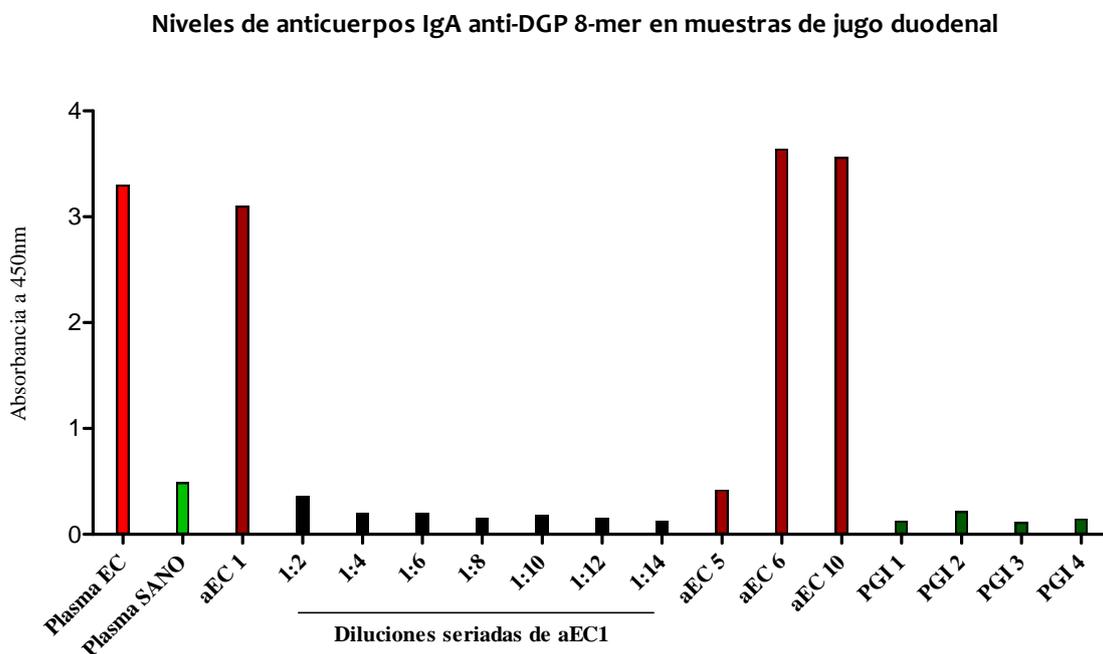


Figura 43: Niveles de anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer muestras de jugo duodenal de pacientes adultos. Grupos de estudio: celíacos en actividad (aEC), celíacos en dieta sin gluten (DSG) y pacientes no celíacos con otra patología gastrointestinal (PGI). Cada barra representa el valor medio de absorbancia para un paciente. En este caso se hizo una curva de diluciones seriadas en PBS de una muestra de un paciente aEC. Se incluyeron dos muestras de plasma control (rojo: plasma de paciente aEC, verde: plasma de individuo SANO). El valor de corte (0.5) se indica con una línea de puntos.

En este segundo ensayo los resultados cambiaron notablemente debido principalmente a diluir el anticuerpo secundario en PBS y no en solución de bloqueo. De alguna manera, la leche en polvo estaba interfiriendo en el ensayo.

Con el protocolo ajustado a las nuevas muestras, se realizó un ensayo más (**Figura 44**) y se calculó el nuevo valor de corte (0.23, línea de puntos) utilizando los valores de absorbancia de las muestras de jugo duodenal de los pacientes PGI. De las 10 muestras de aEC analizadas, 6 de ellas se consideraron positivas, mientras que las 3 muestras de DSG y las 4 muestras de PGI fueron todas negativas para los anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer.

La sensibilidad del ensayo para la detección de anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer en muestras de jugo duodenal fue de 60%, inferior que en las muestras de plasma, sin embargo la especificidad fue del 100%.

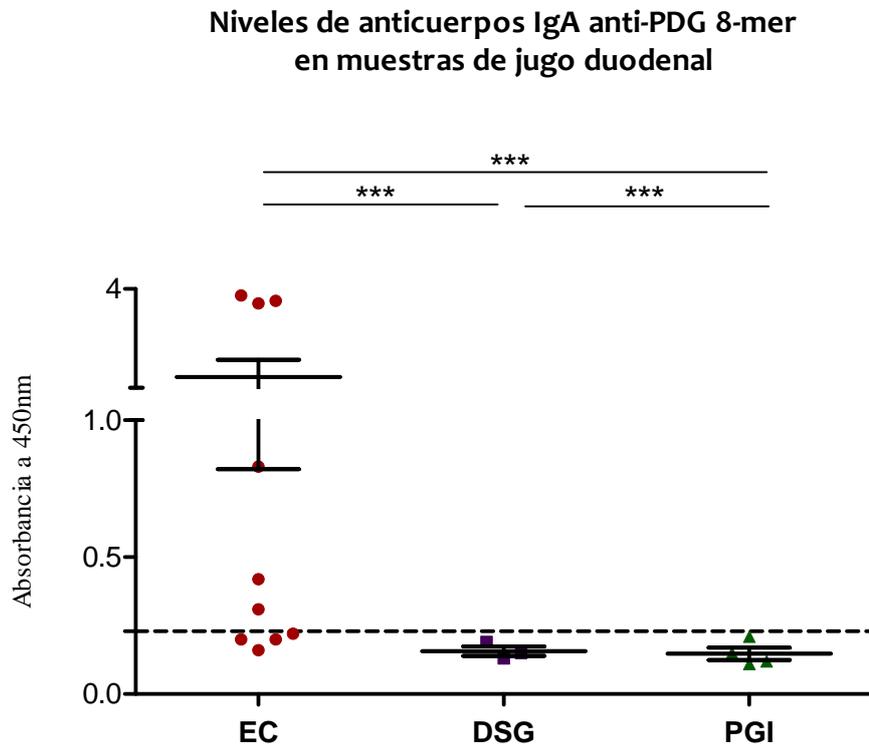


Figura 44: Niveles de anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer pacientes en muestras de jugo duodenal de adultos. Grupos de estudio: celíacos en actividad (aEC), celíacos en dieta sin gluten (DSG) y pacientes no celíacos con otra patología gastrointestinal (PGI). Cada punto representa el valor medio de absorbancia a una densidad óptica de 450nm para un paciente. *** p<0.001.

En la EC existe un increment en la cantidad de anticuerpos IgA presentes en el lumen intestinal. Hace tiempo que se conoce la presencia de anticuerpos IgA anti-gliadina en las secreciones duodenales de los pacientes celíacos [131]. Como se ha explicado en la sección 2.3 de la introducción, recientes trabajos sostienen la existencia de una de retrotranscitosi dependiente de los anticuerpos IgA como posible vía de entrada de los péptidos tóxicos de gluten desde el lumen intestinal, a través del epitelio, hasta la lamina propia. Esto podría explicar la detección de anticuerpos IgA anti-PDG en las muestras de jugo duodenal de los pacientes celíacos y su ausencia con los pacientes control no celíacos. Además, como se observa en la Figura 44, no se observaron niveles detectables de estos anticuerpos en las muestras de jugo duodenal de los pacientes celíacos en DSG.

Capítulo VIII

Resumen y discusión final

La zimografía [215, 257] es una técnica basada en una separación electroforética que permite la identificación de diferentes actividades proteicas en una misma muestra. Esta técnica permite, en un mismo experimento, identificar diferentes proteínas en función de su peso molecular a la vez que revela su capacidad de degradar un sustrato que previamente es incluido en el gel de acrilamida.

Gracias a esta técnica, en trabajos anteriores realizados en nuestro grupo de laboratorio por David.B durante su Tesis Doctoral [208] se describió un patrón de degradación de la gliadina específico del duodeno de los pacientes celíacos, compuesto por siete proteasas con un peso molecular comprendido entre los 20 y 92 kDa. Dada la controversia que rodea a la toxicidad de las avenas para los pacientes celíacos, decidimos estudiar mediante zimografía la capacidad de degradar las aveninas de dos variedades de avena por las proteasas presentes en las biopsias intestinales de los pacientes celíacos, observando degradación solamente en una de las dos variedades. No solo se trata de una degradación específica de los pacientes celíacos, ya que las proteasas duodenales de los pacientes control no degradaron ninguna de las dos variedades, sino que además, ese cultivar de avena ha sido identificado recientemente como tóxico para los pacientes celíacos por Comino y colaboradores [6]. El interés por la posible inclusión de ciertas variedades de avena en la dieta de los pacientes celíacos se ha ido incrementando en los últimos años por lo que el estudio mediante zimografía de la capacidad degradadora por proteasas duodenales de los pacientes celíacos de las diferentes variedades de avena que se conocen hasta el momento podría ser un buen complemento en el estudio de su toxicidad.

El origen de la actividad degradadora de prolaminas característica de la EC es aún desconocido. Una de las teorías predominantes es la posible implicación bacteriana, debido a la existencia de diversos estudios que describen diferencias tanto cualitativas como cuantitativas en la composición de la flora bacteriana entre individuos control y pacientes celíacos. El estudio mediante zimografía de la actividad degradadora de gliadina en muestras de jugo duodenal y cepillado duodenal nos ha permitido dar un paso más en el estudio de las enzimas responsables de esta actividad.

Tanto el jugo duodenal como la muestra de mucosa recogida mediante cepillado de la zona a biopsiar de los pacientes celíacos contienen enzimas capaces de degradar la gliadina, con pesos moleculares muy similares a los observados en las biopsias intestinales de estos pacientes. Las enzimas presentes en las muestras de cepillado de la

mucosa duodenal degradan la gliadina de una forma mucho más intensa que las identificadas en las muestras de tejido. Se ha analizado la actividad degradadora de gliadina en muestras de tejido intestinal tomadas sin previo raspado de la zona a biopsiar, y de muestras de tejido intestinal tomadas después de haber raspado la zona en cuyo caso, se analizó también dicha actividad en la muestra de mucosa recogida en el cepillo. Esto nos ha permitido observar como las enzimas degradadoras de la gliadina podrían localizarse en la capa de mucus que recubre el epitelio, ya que cuando la zona a biopsiar se limpia previamente con un cepillo, la actividad enzimática observada en el tejido disminuye considerablemente, aumentando proporcionalmente en la muestra de cepillado de ese mismo paciente. Además, consideramos que las enzimas podrían estar siendo secretadas a la luz intestinal. Al comparar la actividad degradadora de gliadina en muestras de biopsia y jugo duodenal tomadas a la vez del mismo paciente celiaco, se observa como la actividad enzimática se mantiene de una forma muy débil en el jugo duodenal, aunque el número de bandas de degradación es menor.

No se observan diferencias destacables entre la actividad enzimática observada en la mucosa duodenal de los pacientes celiacos en actividad y los pacientes en DSG. Suponiendo que esta actividad enzimática se deba a diferencias en la composición de la flora bacteriana entre los pacientes celiacos y los individuos sanos, parece razonable que aunque el paciente esté en DSG siga teniendo capacidad de degradarlo. Además, no se observó actividad degradadora de gliadina en ninguna de las muestras duodenales procedentes de pacientes control no celiacos, por lo tanto, la especificidad de estas proteasas se extiende a las observadas en las secreciones duodenales y en la capa de mucus. Para poder confirmar esta teoría, sería necesario estudiar la actividad enzimática degradadora de gliadina en los tres tipos de muestra (tejido, secreción y mucus) tomados a la vez de un mismo paciente, tanto en pacientes celiacos (en actividad y en DSG) como en pacientes control no celiacos.

El análisis por espectrometría de masas de trampa iónica de dos de las bandas de degradación que componen el patrón descrito previamente en muestras de biopsia intestinal de los pacientes celiacos, permitió la identificación del péptido 8-mer (FPLQPQQP) derivado de la digestión de la ω -gliadina por proteasas duodenales específicas de los pacientes celiacos [211]. En esta Tesis se ha estudiado la presencia

del péptido 8-mer en las proteínas que resultan tóxicas para los pacientes celíacos.

Las búsquedas realizadas en la base de datos del NCBI revelaron más de 250 secuencias homólogas al péptido 8-mer, todas ellas en prolaminas y gluteninas de cereales tóxicos para los celíacos: trigo, cebada y centeno, mientras que no se encontró ninguna de estas secuencias en cereales como el arroz o el maíz, que no tienen ningún efecto en estos pacientes. El péptido 8-mer aparecía con mucha mayor frecuencia en las ω -prolaminas (gliadina y secalina) que en otras prolaminas.

Una vez comprobada la presencia del péptido en los cereales tóxicos, se realizó una búsqueda de los epítomos de gluten de células T conocidos hasta el momento [62] incluidos en las secuencias de las prolaminas donde se encontró el péptido 8-mer, con el objetivo de conocer si la secuencia del péptido se encontraba próxima a alguno de dichos epítomos. Se analizó la presencia de un total de 31 epítomos de gluten de los cuales se seleccionaron 3 de ellos por aparecer solapados o muy próximos al péptido 8-mer. Estos hallazgos sugirieron en primer lugar que, al igual que ocurre con los péptidos de gluten identificados como tóxicos para estos pacientes, el péptido 8-mer podría tener un efecto directo sobre el epitelio intestinal. En segundo lugar, el péptido 8-mer podría ser reconocido por las células T en el contexto de las moléculas HLA-DQ y desencadenar, por tanto, una respuesta inmune en los pacientes celíacos.

La información obtenida mediante los estudios *in silico* junto con los resultados de los ensayos de zimografía con las muestras de jugo y cepillado duodenal, nos llevaron a plantear el segundo objetivo general de esta tesis: estudiar el efecto directo del péptido 8-mer en el epitelio intestinal de los pacientes celíacos, valorando si las muestras de jugo duodenal o cepillado duodenal tienen algún efecto sobre el epitelio intestinal y sobre la interacción del péptido 8-mer con el epitelio. Para ello se utilizó la línea celular Caco-2 como modelo *in vitro* de células del epitelio intestinal. Los ensayos de inmunofluorescencia nos han permitido comprobar que las muestras de jugo duodenal de los pacientes celíacos en actividad alteran la morfología de las uniones estrechas de las células Caco-2 de una forma muy similar a la gliadina y el gluten. Las muestras tomadas de pacientes celíacos en DSG no inducen ningún cambio apreciable mediante microscopía de fluorescencia en estas uniones, al igual que las muestras de pacientes control no celíacos.

Se analizaron mediante PCR cuantitativa los niveles de expresión de algunas de las moléculas implicadas de alguna manera en la patogenia de la EC. Para ello, las células Caco-2 fueron estimuladas durante 16 horas con el péptido 8-mer, el péptido 33-mer como control positivo y un péptido control del 8-mer (cambio de un aminoácido) como control negativo, antes y después de incubar las células durante 24 horas con muestras de jugo y cepillado duodenal procedentes de pacientes celíacos en actividad, pacientes celíacos en DSG y pacientes control no celíacos. Los resultados muestran como los péptidos por sí solos no modifican los niveles de expresión de la IL-15, sin embargo, previa incubación de las células con las muestras de cepillado duodenal de los pacientes celíacos, los péptidos 8-mer y 33-mer incrementan la expresión de la IL-15 por las células Caco-2. La IL-15 es producida principalmente por los macrófagos, pero también por células no linfoides y por los enterocitos. Es una citocina clave en el mantenimiento de la homeostasis entre la inmunidad innata y adaptativa y una alteración de su expresión está asociada a una gran cantidad de desordenes intestinales como la EC. Las células del epitelio intestinal de los pacientes celíacos producen mayor cantidad de IL-15 que los pacientes celíacos tratados en DSG y los pacientes control no celíacos.

No se observaron diferencias en los niveles de expresión del TGF- β tras el estímulo de las células con los tres péptidos sintéticos, sin embargo, cuando las células fueron previamente incubadas con las muestras de jugo duodenal de los pacientes celíacos, el péptido 33-mer disminuyó de forma significativa la expresión de TGF- β . Se ha propuesto que en condiciones de inflamación crónica, la IL-15 bloquea la vía de señalización del TGF- β , lo cual podría ser una interpretación de nuestros resultados. Si así fuera, la IL-15 responsable de la disminución de la expresión del TGF- β podría estar presente en las propias muestras de jugo duodenal de los pacientes celíacos en actividad o bien, podría estar siendo secretada por las células caco-2 como consecuencia de su incubación previa con el jugo duodenal.

Por otro lado, se observó un incremento en la expresión de la molécula MICA en las células caco-2 cuando estas eran estimuladas con muestras de jugo duodenal de pacientes celíacos (tanto aEC como DSG), y cuando se estimularon con los péptidos 8-mer y 33-mer, a diferencia del péptido control del 8-mer que indujo una disminución de la expresión de esta molécula. Sin embargo, en contra de lo esperado, el incremento en

la expresión de MICA observado tras el estímulo con los péptidos 8-mer y 33-mer, desaparecía cuando las células eran incubadas previamente con las muestras de jugo duodenal tanto de pacientes aEC como de pacientes en DSG. Los resultados obtenidos con las muestras de cepillado duodenal se aproximaron más a lo esperado, ya que el efecto inductor de la expresión de MICA provocado por los péptidos 8-mer y 33-mer, disminuía con la incubación previa de las células caco con los cepillados duodenales de los pacientes control PGI y de los pacientes DSG, mientras que los cepillados de los pacientes aEC no parecían alterar el efecto de los péptidos. Una posible interpretación de estos resultados es que la capa de mucus de los pacientes control no celíacos, protege de alguna manera al epitelio intestinal del estrés y el daño provocado por los péptidos tóxicos de gluten. Además, las diferencias en la expresión de MICA entre los pacientes celíacos aEC y DSG podría estar relacionada con el grado de atrofia intestinal presente en la mucosa de dichos pacientes, ya que parece que las muestras de mucus de los pacientes que no consumen gluten tuvo un efecto más similar al de los pacientes control que al de los pacientes celíacos en actividad.

Los análisis de expresión molecular de dos de las proteínas que componen las uniones estrechas de las células del epitelio intestinal revelaron como las muestras de cepillado duodenal de los pacientes aEC disminuyeron la expresión tanto de la ocludina como de la Zo-1 comparado con los niveles detectados tras el estímulo con el cepillado duodenal de los pacientes PGI. Los niveles de expresión de ambas proteínas aumentaron de igual manera tras el estímulo de las células con cualquiera de los tres péptidos sintéticos. En el caso del 8-mer, su efecto en la expresión de la ocludina y de Zo-1 parecía ligeramente mayor cuando las células se incubaron previamente con los cepillados duodenales de los pacientes aEC. Las muestras de cepillados duodenales de los pacientes DSG, contrarrestaron el efecto inductor de la expresión de la Zo-1 producido por el péptido 33-mer, mientras que en el caso del péptido 8-mer, fueron los cepillados de los pacientes PGI lo que tendieron a disminuir el incremento de la expresión de esta proteína. Estos resultados parecen indicar que las muestras de jugo duodenal no parecen interferir en el efecto tóxico de los péptidos sobre el epitelio, sin embargo, las muestras de cepillado duodenal de los pacientes celíacos incrementan la expresión de las proteínas de las uniones estrechas, efecto que ha sido descrito tras el estímulo con gliadina. Por el contrario, las muestras de cepillado duodenal e los

pacientes PGI podrían tener un efecto protector sobre las uniones estrechas del epitelio intestinal.

El péptido 8-mer tiene un efecto directo sobre el epitelio intestinal comparable al péptido 33-mer, aunque parece que el daño provocado es aun mayor en presencia de las muestras de cepillado duodenal de los pacientes celíacos.

Con el objetivo de comprobar si el péptido 8-mer podría ser capaz de inducir una respuesta inmune en los pacientes celíacos, se diseñó y estandarizó un ensayo ELISA que permitiera realizar una búsqueda de anticuerpos IgA específicos que reconocieran el péptido 8-mer como un antígeno. No solo se han detectado anticuerpos IgA que reconocen de forma específica el péptido 8-mer en muestras de plasma de pacientes celíacos, sino que tras comparar los resultados obtenidos con el péptido 8-mer en estado nativo, y el péptido 8-mer desaminado, comprobamos como la desaminación incrementaba notablemente el reconocimiento del péptido por parte de los anticuerpos. Mediante este hallazgo hemos comprobado que el péptido 8-mer es generado in vivo en el duodeno de los pacientes celíacos tras la digestión del gluten y que muy probablemente es desaminado por la enzima TGt. Una vez optimizado el ensayo, se realizó un estudio tanto en la población adulta como en la población infantil en el que se incluyó un total de 259 muestras de plasma de diferentes grupos de pacientes. Se ha demostrado que los anticuerpos IgA frente al péptido 8-mer desaminado son específicos de los pacientes celíacos, independientemente de la edad. Además, sus niveles se normalizan tras al menos un mes en dieta sin gluten, llegando a revelar en dos pacientes una falta de respuesta a la dieta sin gluten. El estudio de la presencia de estos anticuerpos en muestras de plasma de pacientes con EII nos permitió comprobar la alta especificidad de estos anticuerpos, ya que a pesar de tratarse de pacientes con unas condiciones de inflamación y atrofia intestinal similares a las observadas en los pacientes celíacos, no se detectaron anticuerpos IgA anti-PDG 8-mer en el 93,5% de los casos estudiados.

Por último, se realizaron algunos ajustes en el protocolo del ensayo ELISA IgA anti-PDG 8-mer para realizar una búsqueda de estos anticuerpos en muestras de jugo duodenal de pacientes celíacos (tanto en actividad como en dieta sin gluten) y de pacientes control no celíacos. Los ensayos revelaron la presencia de anticuerpos IgA específicos frente al péptido 8-mer desaminado únicamente en las muestras de los

pacientes aEC, con una especificidad del 100%. Esos resultados confirman una vez más la presencia *in vivo* del péptido 8-mer en el duodeno de los pacientes celíacos. Por otro lado, la presencia de estos anticuerpos podría estar relacionado con el paso de los péptidos de gluten a través del epitelio mediante una retrotranscitosis mediada por los anticuerpos IgA.

En resumen, los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis doctoral nos han permitido identificar la existencia de proteasas duodenales específicas de los pacientes celíacos capaces de degradar de una forma específica la gliadina. Como consecuencia de esta degradación, el péptido 8-mer es liberado en el lumen intestinal y tras su contacto directo con el epitelio intestinal, produce alteraciones tanto en las uniones estrechas de los enterocitos como en la expresión de algunas de las citocinas involucradas en la patogenia de la EC. Este péptido, quizás a través de una vía de retrotranscitosis, alcanza la lámina propia donde parece ser desaminado por la enzima TGt. Una vez desaminado, el péptido 8-mer es reconocido por las células T a través de las moléculas HLA, produciéndose una activación de las células B, las cuales proliferan y secretan anticuerpos IgA específicos frente a ese péptido. La especificidad y sensibilidad de estos anticuerpos en el plasma de estos pacientes es muy elevada, de manera que podrían ser utilizados como marcadores serológicos en el diagnóstico de la EC y en el seguimiento de la DSG.

Capítulo IX

Conclusiones

Conclusión 1: Las proteasas presentes en la mucosa duodenal de los pacientes celíacos son capaces de degradar de forma específica las prolaminas de una de las dos variedades de avena estudiadas, que además es reconocida por el anticuerpo monoclonal G12 específico frente al péptido inmunogénico 33-mer.

Conclusión 2: La actividad degradadora de gliadina específica de los pacientes celíacos es más intensa y definida en la capa de mucus que recubre el epitelio intestinal que en el propio tejido. Además, esa actividad se mantiene en las secreciones duodenales, aunque con menor intensidad y número de bandas de degradación.

Conclusión 3: El péptido 8-mer se encuentra únicamente en los cereales tóxicos para los pacientes celíacos (trigo, cebada y centeno), y además es un producto derivado de la degradación de las prolaminas de estos cereales por proteasas duodenales específicas de los pacientes celíacos.

Conclusión 4: La secuencia del péptido 8-mer aparece solapada o está muy próxima a tres de los epítomos de gluten de células T conocidos hasta el momento y por lo tanto, podría ser presentado por las células presentadoras de antígeno en el contexto de moléculas HLA-DQ2.

Conclusión 5: Las muestras de jugo duodenal de los pacientes celíacos provocan modificaciones estructurales de las uniones estrechas en células Caco-2 de una forma muy similar al gluten, mientras que las muestras de los pacientes control no celíacos o pacientes celíacos en dieta sin gluten no inducen ningún tipo de alteración.

Conclusión 6: Las muestras de cepillado duodenal de los pacientes celíacos en actividad podrían favorecer el efecto tóxico directo de los péptidos de gluten sobre el epitelio intestinal, mientras que las muestras de cepillado duodenal de los pacientes control no celíacos parecen tener proteger al epitelio del efecto tóxico de dichos péptidos.

Conclusión 7: La afinidad de los anticuerpos IgA frente al péptido 8-mer desaminado es mucho mayor que cuando el péptido se encuentra en su estado nativo, lo que sugiere que es generado *in vivo* en los pacientes celíacos y posteriormente modificado por la enzima transglutaminasa tisular.

Conclusión 8: La detección de anticuerpos IgA específicos frente al péptido 8-mer en muestras de plasma de pacientes celíacos, y su ausencia en los pacientes control no celíacos, confirma la capacidad del péptido de generar una respuesta inmune humoral en los pacientes celíacos, además de su presencia *in vivo* en el duodeno de estos pacientes.

Conclusión 9: El ensayo ELISA diseñado para la detección de anticuerpos IgA específicos frente al péptido 8-mer desaminado constituye una nueva herramienta con múltiples utilidades tanto en el apoyo al diagnóstico de la enfermedad celíaca como en el seguimiento de la dieta sin gluten en niños y adultos.

Conclusión 10: La ausencia de anticuerpos IgA específicos frente al péptido desaminado 8-mer en plasma de pacientes con otras patologías gastrointestinales, confirma que el test ELISA IgA anti-PDG 8-mer podría ser de ayuda en el diagnóstico diferencial de estos pacientes.

Capítulo X

Bibliografía

1. Shewry PR, Beaudoin F, Jenkins J, Griffiths-Jones S, Mills EN. Plant protein families and their relationships to food allergy. *Biochem Soc Trans.* 2002 Nov;30(Pt 6):906-10.
2. Wieser H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol.* 2007 Apr;24(2):115-9.
3. Wieser H. Relation between gliadin structure and coeliac toxicity. *Acta Paediatr Suppl.* 1996 May;412:3-9.
4. Field JM, Shewry PR, Mifflin BJ. Aggregation states of alcohol-soluble storage proteins of barley, rye, wheat and maize. *J Sci Food Agric.* 1983 Apr;34(4):362-9.
5. Sollid LM. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol.* 2002 Sep;2(9):647-55.
6. Comino I, Real A, de Lorenzo L, Cornell H, Lopez-Casado MA, Barro F, et al. Diversity in oat potential immunogenicity: basis for the selection of oat varieties with no toxicity in coeliac disease. *Gut.* 2011 Jul;60(7):915-22.
7. Sadiq Butt M, Tahir-Nadeem M, Khan MK, Shabir R, Butt MS. Oat: unique among the cereals. *Eur J Nutr.* 2008 Mar;47(2):68-79.
8. Janatuinen EK, Pikkarainen PH, Kemppainen TA, Kosma VM, Jarvinen RM, Uusitupa MI, et al. A comparison of diets with and without oats in adults with celiac disease. *N Engl J Med.* 1995 Oct 19;333(16):1033-7.
9. Thompson T. Oats and the gluten-free diet. *J Am Diet Assoc.* 2003 Mar;103(3):376-9.
10. Pulido OM, Gillespie Z, Zarkadas M, Dubois S, Vavasour E, Rashid M, et al. Introduction of oats in the diet of individuals with celiac disease: a systematic review. *Adv Food Nutr Res.* 2009;57:235-85.
11. Lundin KE, Nilsen EM, Scott HG, Loberg EM, Gjoen A, Bratlie J, et al. Oats induced villous atrophy in coeliac disease. *Gut.* 2003 Nov;52(11):1649-52.
12. Silano M, Di Benedetto R, Maialetti F, De Vincenzi A, Calcaterra R, Cornell HJ, et al. Avenins from different cultivars of oats elicit response by coeliac peripheral

lymphocytes. *Scand J Gastroenterol.* 2007 Nov;42(11):1302-5.

13. Arentz-Hansen H, Fleckenstein B, Molberg O, Scott H, Koning F, Jung G, et al. The molecular basis for oat intolerance in patients with celiac disease. *PLoS Med.* 2004 Oct;1(1):e1.

14. D.M. Londono WPCvtW, S. Goryunova, M.J.M. Smulders. Avenin diversity analysis of the genus *Avena* (oat). Relevance for people with celiac disease. *Journal of Cereal Science.* 2013.

15. Jabri B, Sollid LM. Tissue-mediated control of immunopathology in coeliac disease. *Nat Rev Immunol.* 2009 Dec;9(12):858-70.

16. Losowsky MS. A history of coeliac disease. *Dig Dis.* 2008;26(2):112-20.

17. Haas SV. Celiac disease. *N Y State J Med.* 1963 May 1;63:1346-50.

18. Dicke WK, Weijers HA, Van De Kamer JH. Coeliac disease. II. The presence in wheat of a factor having a deleterious effect in cases of coeliac disease. *Acta Paediatr.* 1953 Jan;42(1):34-42.

19. Van De Kamer JH, Weijers HA, Dicke WK. Coeliac disease. IV. An investigation into the injurious constituents of wheat in connection with their action on patients with coeliac disease. *Acta Paediatr.* 1953 May;42(3):223-31.

20. van Berge-Henegouwen GP, Mulder CJ. Pioneer in the gluten free diet: Willem-Karel Dicke 1905-1962, over 50 years of gluten free diet. *Gut.* 1993 Nov;34(11):1473-5.

21. Parada A, Araya M. [History of gluten and its effects on celiac disease]. *Rev Med Chil.* 2010 Oct;138(10):1319-25.

22. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PH, et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut.* 2013 Jan;62(1):43-52.

23. Catassi C, Fabiani E, Ratsch IM, Coppa GV, Giorgi PL, Pierdomenico R, et al. The coeliac iceberg in Italy. A multicentre antigliadin antibodies screening for coeliac

disease in school-age subjects. *Acta Paediatr Suppl.* 1996 May;412:29-35.

24. A. Villavicencio-Pérez CB-L, A.S. Peña. La Enfermedad Celiaca en China y Centroamérica. En Rodrigo L y Peña AS, editores. *Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca.* OmniaScience. 2013;p.61-74.

25. Cummins AG, Roberts-Thomson IC. Prevalence of celiac disease in the Asia-Pacific region. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009 Aug;24(8):1347-51.

26. Catassi C, Doloretta Macis M, Ratsch IM, De Virgiliis S, Cucca F. The distribution of DQ genes in the Saharawi population provides only a partial explanation for the high celiac disease prevalence. *Tissue Antigens.* 2001 Dec;58(6):402-6.

27. West J, Logan RF, Hill PG, Khaw KT. The iceberg of celiac disease: what is below the waterline? *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007 Jan;5(1):59-62.

28. Talley NJ, Valdovinos M, Petterson TM, Carpenter HA, Melton LJ, 3rd. Epidemiology of celiac sprue: a community-based study. *Am J Gastroenterol.* 1994 Jun;89(6):843-6.

29. Lionetti E, Catassi C. New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment. *Int Rev Immunol.* 2011 Aug;30(4):219-31.

30. Barada K, Abu Daya H, Rostami K, Catassi C. Celiac disease in the developing world. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2012 Oct;22(4):773-96.

31. Cilleruelo ML RE, Jiménez J, Rivero MJ, Barrio J, Castaño A et al. Enfermedad celíaca silente: explorando el iceberg en población escolar. *An Esp Pediatr.* 2002;57:321-6.

32. Riestra S, Fernandez E, Rodrigo L, Garcia S, Ocio G. Prevalence of Coeliac disease in the general population of northern Spain. Strategies of serologic screening. *Scand J Gastroenterol.* 2000 Apr;35(4):398-402.

33. Castano L, Blarduni E, Ortiz L, Nunez J, Bilbao JR, Rica I, et al. Prospective population screening for celiac disease: high prevalence in the first 3 years of life. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004 Jul;39(1):80-4.

34. Garcia Novo MD, Garfia C, Acuna Quiros MD, Asensio J, Zancada G, Barrio Gutierrez S, et al. [Prevalence of celiac disease in apparently healthy blood donors in the autonomous community of Madrid]. *Rev Esp Enferm Dig.* 2007 Jun;99(6):337-42.
35. Pabst O, Mowat AM. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol.* 2012 May;5(3):232-9.
36. Chehade M, Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J Allergy Clin Immunol.* 2005 Jan;115(1):3-12; quiz 3.
37. Hmida NB, Ben Ahmed M, Moussa A, Rejeb MB, Said Y, Kourda N, et al. Impaired control of effector T cells by regulatory T cells: a clue to loss of oral tolerance and autoimmunity in celiac disease? *Am J Gastroenterol.* 2012 Apr;107(4):604-11.
38. Brandtzaeg P. The changing immunological paradigm in coeliac disease. *Immunol Lett.* 2006 Jun 15;105(2):127-39.
39. Houchins JP, Yabe T, McSherry C, Bach FH. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med.* 1991 Apr 1;173(4):1017-20.
40. Tagaya Y, Bamford RN, DeFilippis AP, Waldmann TA. IL-15: a pleiotropic cytokine with diverse receptor/signaling pathways whose expression is controlled at multiple levels. *Immunity.* 1996 Apr;4(4):329-36.
41. Green PH, Jabri B. Coeliac disease. *Lancet.* 2003 Aug 2;362(9381):383-91.
42. Bahram S, Spies T. The MIC gene family. *Res Immunol.* 1996 Jun;147(5):328-33.
43. Heyman M, Menard S. Pathways of gliadin transport in celiac disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 May;1165:274-8.
44. Fleckenstein B, Molberg O, Qiao SW, Schmid DG, von der Mulbe F, Elgstoen K, et al. Gliadin T cell epitope selection by tissue transglutaminase in celiac disease. Role of enzyme specificity and pH influence on the transamidation versus deamidation process. *J Biol Chem.* 2002 Sep 13;277(37):34109-16.

45. Fleckenstein B, Qiao SW, Larsen MR, Jung G, Roepstorff P, Sollid LM. Molecular characterization of covalent complexes between tissue transglutaminase and gliadin peptides. *J Biol Chem*. 2004 Apr 23;279(17):17607-16.
46. Molberg O, McAdam SN, Korner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L, et al. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med*. 1998 Jun;4(6):713-7.
47. van de Wal Y, Kooy Y, van Veelen P, Pena S, Mearin L, Papadopoulos G, et al. Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *J Immunol*. 1998 Aug 15;161(4):1585-8.
48. Dorum S, Qiao SW, Sollid LM, Fleckenstein B. A quantitative analysis of transglutaminase 2-mediated deamidation of gluten peptides: implications for the T-cell response in celiac disease. *J Proteome Res*. 2009 Apr;8(4):1748-55.
49. Leon AJ, Gomez E, Garrote JA, Bernardo D, Barrera A, Marcos JL, et al. High levels of proinflammatory cytokines, but not markers of tissue injury, in unaffected intestinal areas from patients with IBD. *Mediators Inflamm*. 2009;2009:580450.
50. Leon AJ, Garrote JA, Arranz E. [Cytokines in the pathogeny of celiac disease]. *Med Clin (Barc)*. 2005 Oct 15;125(13):508-16.
51. Aoki CA, Borchers AT, Li M, Flavell RA, Bowlus CL, Ansari AA, et al. Transforming growth factor beta (TGF-beta) and autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2005 Sep;4(7):450-9.
52. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev*. 2001 Aug;182:207-14.
53. Mohamed BM, Feighery C, Kelly J, Coates C, O'Shea U, Barnes L, et al. Increased protein expression of matrix metalloproteinases -1, -3, and -9 and TIMP-1 in patients with gluten-sensitive enteropathy. *Dig Dis Sci*. 2006 Oct;51(10):1862-8.
54. Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Mar 7;1477(1-2):267-83.

55. Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Bauer M, Della Riccia DN, Bizzini F, Biagi F, et al. Matrix metalloproteinase pattern in celiac duodenal mucosa. *Lab Invest.* 2005 Mar;85(3):397-407.
56. Louka AS, Sollid LM. HLA in coeliac disease: unravelling the complex genetics of a complex disorder. *Tissue Antigens.* 2003 Feb;61(2):105-17.
57. Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J Exp Med.* 1989 Jan 1;169(1):345-50.
58. Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer 1989.
59. Karell K, Louka AS, Moodie SJ, Ascher H, Clot F, Greco L, et al. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Hum Immunol.* 2003 Apr;64(4):469-77.
60. Mazzarella G, Maglio M, Paparo F, Nardone G, Stefanile R, Greco L, et al. An immunodominant DQ8 restricted gliadin peptide activates small intestinal immune response in in vitro cultured mucosa from HLA-DQ8 positive but not HLA-DQ8 negative coeliac patients. *Gut.* 2003 Jan;52(1):57-62.
61. Lundin KE, Scott H, Hansen T, Paulsen G, Halstensen TS, Fausa O, et al. Gliadin-specific, HLA-DQ(alpha 1*0501,beta 1*0201) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. *J Exp Med.* 1993 Jul 1;178(1):187-96.
62. Sollid LM, Qiao SW, Anderson RP, Gianfrani C, Koning F. Nomenclature and listing of celiac disease relevant gluten T-cell epitopes restricted by HLA-DQ molecules. *Immunogenetics.* 2012 Jun;64(6):455-60.
63. Sollid LM, Lie BA. Celiac disease genetics: current concepts and practical applications. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005 Sep;3(9):843-51.

64. Nistico L, Fagnani C, Coto I, Percopo S, Cotichini R, Limongelli MG, et al. Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins. *Gut*. 2006 Jun;55(6):803-8.
65. Fernandez-Jimenez N P-IL, Bilbao JR. La Enfermedad Celíaca: Marcadores genéticos. En Rodrigo L y Peña AS, editores. *Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca*. OmniaScience. 2013;p.103-21.
66. Trynka G, Wijmenga C, van Heel DA. A genetic perspective on coeliac disease. *Trends Mol Med*. 2010 Nov;16(11):537-50.
67. Dubois PC, Trynka G, Franke L, Hunt KA, Romanos J, Curtotti A, et al. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat Genet*. 2010 Apr;42(4):295-302.
68. Norstrom F, Sandstrom O, Lindholm L, Ivarsson A. A gluten-free diet effectively reduces symptoms and health care consumption in a Swedish celiac disease population. *BMC Gastroenterol*. 2012;12:125.
69. Hausch F, Shan L, Santiago NA, Gray GM, Khosla C. Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002 Oct;283(4):G996-G1003.
70. Frazer AC, Fletcher RF, Ross CA, Shaw B, Sammons HG, Schneider R. Gluten-induced enteropathy: the effect of partially digested gluten. *Lancet*. 1959 Sep 5;2(7097):252-5.
71. Venalainen JI, Juvonen RO, Mannisto PT. Evolutionary relationships of the prolyl oligopeptidase family enzymes. *Eur J Biochem*. 2004 Jul;271(13):2705-15.
72. Di Sabatino A, Corazza GR. Coeliac disease. *Lancet*. 2009 Apr 25;373(9673):1480-93.
73. Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Corazza GR. The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clin Exp Immunol*. 2005 Jun;140(3):408-16.
74. Stern M, Ciclitira PJ, van Eckert R, Feighery C, Janssen FW, Mendez E, et al. Analysis and clinical effects of gluten in coeliac disease. *Eur J*

Gastroenterol Hepatol. 2001 Jun;13(6):741-7.

75. Folk JE. Mechanism and basis for specificity of transglutaminase-catalyzed epsilon-(gamma-glutamyl) lysine bond formation. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1983;54:1-56.

76. Comino I, Real A, Moreno Mde L, Montes R, Cebolla A, Sousa C. Immunological determination of gliadin 33-mer equivalent peptides in beers as a specific and practical analytical method to assess safety for celiac patients. *J Sci Food Agric.* 2013 Mar 15;93(4):933-43.

77. Tye-Din JA, Stewart JA, Dromei JA, Beissbarth T, van Heel DA, Tatham A, et al. Comprehensive, quantitative mapping of T cell epitopes in gluten in celiac disease. *Sci Transl Med.* 2010 Jul 21;2(41):41ra51.

78. Cornell HJ, Townley RR. Investigation of possible intestinal peptidase deficiency in coeliac disease. *Clin Chim Acta.* 1973 Jan 10;43(1):113-25.

79. Siegel M, Bethune MT, Gass J, Ehren J, Xia J, Johannsen A, et al. Rational design of combination enzyme therapy for celiac sprue. *Chem Biol.* 2006 Jun;13(6):649-58.

80. Norris JM, Barriga K, Hoffenberg EJ, Taki I, Miao D, Haas JE, et al. Risk of celiac disease autoimmunity and timing of gluten introduction in the diet of infants at increased risk of disease. *JAMA.* 2005 May 18;293(19):2343-51.

81. Ivarsson A, Myleus A, Norstrom F, van der Pals M, Rosen A, Hogberg L, et al. Prevalence of childhood celiac disease and changes in infant feeding. *Pediatrics.* 2013 Mar;131(3):e687-94.

82. Ivarsson A, Persson LA, Nystrom L, Ascher H, Cavell B, Danielsson L, et al. Epidemic of coeliac disease in Swedish children. *Acta Paediatr.* 2000 Feb;89(2):165-71.

83. Ivarsson A, Hernell O, Nystrom L, Persson LA. Children born in the summer have increased risk for coeliac disease. *J Epidemiol Community Health.* 2003 Jan;57(1):36-9.

84. Cammarota G, Cuoco L, Cianci R, Pandolfi F, Gasbarrini G.

Onset of coeliac disease during treatment with interferon for chronic hepatitis C. *Lancet*. 2000 Oct 28;356(9240):1494-5.

85. Holm S, Andersson Y, Gothefors L, Lindberg T. Increased protein absorption after acute gastroenteritis in children. *Acta Paediatr*. 1992 Aug;81(8):585-8.

86. Troncone R, Auricchio S. Rotavirus and celiac disease: clues to the pathogenesis and perspectives on prevention. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007 May;44(5):527-8.

87. Hober D, Sauter P. Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus: interplay between enterovirus and host. *Nat Rev Endocrinol*. 2010 May;6(5):279-89.

88. Stene LC, Honeyman MC, Hoffenberg EJ, Haas JE, Sokol RJ, Emery L, et al. Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. *Am J Gastroenterol*. 2006 Oct;101(10):2333-40.

89. Zanoni G, Navone R, Lunardi C, Tridente G, Bason C, Sivori S, et al. In celiac disease, a subset of autoantibodies against transglutaminase binds toll-like receptor 4 and induces activation of monocytes. *PLoS Med*. 2006 Sep;3(9):e358.

90. Siegel M, Strnad P, Watts RE, Choi K, Jabri B, Omary MB, et al. Extracellular transglutaminase 2 is catalytically inactive, but is transiently activated upon tissue injury. *PLoS One*. 2008;3(3):e1861.

91. Sollid LM, Jabri B. Triggers and drivers of autoimmunity: lessons from coeliac disease. *Nat Rev Immunol*. 2013 Apr;13(4):294-302.

92. Salzman NH, Hung K, Haribhai D, Chu H, Karlsson-Sjoberg J, Amir E, et al. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat Immunol*. 2010 Jan;11(1):76-83.

93. Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2004 Jun;4(6):478-85.

94. Smith K, McCoy KD, Macpherson AJ. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin Immunol*. 2007 Apr;19(2):59-69.

95. McCole DF, Barrett KE. Varied role of the gut epithelium in mucosal homeostasis. *Curr Opin Gastroenterol*. 2007 Nov;23(6):647-54.
96. Raz E. Mucosal immunity: aliment and ailments. *Mucosal Immunol*. Jan;3(1):4-7.
97. Iltanen S, Holm K, Ashorn M, Ruuska T, Laippala P, Maki M. Changing jejunal gamma delta T cell receptor (TCR)-bearing intraepithelial lymphocyte density in coeliac disease. *Clin Exp Immunol*. 1999 Jul;117(1):51-5.
98. Forsberg G, Fahlgren A, Horstedt P, Hammarstrom S, Hernell O, Hammarstrom ML. Presence of bacteria and innate immunity of intestinal epithelium in childhood celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2004 May;99(5):894-904.
99. Tjellstrom B, Stenhammar L, Hogberg L, Falth-Magnusson K, Magnusson KE, Midtvedt T, et al. Gut microflora associated characteristics in children with celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2005 Dec;100(12):2784-8.
100. Sollid LM, Gray GM. A role for bacteria in celiac disease? *Am J Gastroenterol*. 2004 May;99(5):905-6.
101. Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Jul;124(1):3-20; quiz 1-2.
102. Menard S, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. *Mucosal Immunol*. 2010 May;3(3):247-59.
103. Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol*. 1963 May;17:375-412.
104. Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Mar;1778(3):660-9.
105. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Apr;2(4):285-93.
106. Forster C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease.

Histochem Cell Biol. 2008 Jul;130(1):55-70.

107. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol.* 1993 Dec;123(6 Pt 2):1777-88.

108. Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jan 19;96(2):511-6.

109. Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol.* 1999 Dec 13;147(6):1351-63.

110. Visser J, Rozing J, Sapone A, Lammers K, Fasano A. Tight junctions, intestinal permeability, and autoimmunity: celiac disease and type 1 diabetes paradigms. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 May;1165:195-205.

111. Heyman M, Abed J, Lebreton C, Cerf-Bensussan N. Intestinal permeability in coeliac disease: insight into mechanisms and relevance to pathogenesis. *Gut.* 2012 Sep;61(9):1355-64.

112. Fihn BM, Sjoqvist A, Jodal M. Permeability of the rat small intestinal epithelium along the villus-crypt axis: effects of glucose transport. *Gastroenterology.* 2000 Oct;119(4):1029-36.

113. Watson CJ, Rowland M, Warhurst G. Functional modeling of tight junctions in intestinal cell monolayers using polyethylene glycol oligomers. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001 Aug;281(2):C388-97.

114. Rescigno M, Rotta G, Valzasina B, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers. *Immunobiology.* 2001 Dec;204(5):572-81.

115. Hase K, Kawano K, Nochi T, Pontes GS, Fukuda S, Ebisawa M, et al. Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature.* 2009 Nov 12;462(7270):226-30.

116. Mallegol J, Van Niel G, Lebreton C, Lepelletier Y, Candalh C, Dugave C, et al. T84-intestinal epithelial exosomes bear MHC class II/peptide complexes potentiating antigen presentation by dendritic cells. *Gastroenterology*. 2007 May;132(5):1866-76.
117. Worbs T, Bode U, Yan S, Hoffmann MW, Hintzen G, Bernhardt G, et al. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med*. 2006 Mar 20;203(3):519-27.
118. Careddu P, Chiumello G, Vaccari A, Bardare M, Zilocchi A. [Effects of Gluten on Intestinal Absorption and Permeability during Remission of Celiac Disease]. *Boll Soc Ital Biol Sper*. 1963 Nov 15;39:1235-8.
119. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*. 1989 Mar;96(3):736-49.
120. Giovannini C, Sanchez M, Straface E, Scazzocchio B, Silano M, De Vincenzi M. Induction of apoptosis in caco-2 cells by wheat gliadin peptides. *Toxicology*. 2000 Apr 7;145(1):63-71.
121. Van De Walle J, Hendrickx A, Romier B, Larondelle Y, Schneider YJ. Inflammatory parameters in Caco-2 cells: effect of stimuli nature, concentration, combination and cell differentiation. *Toxicol In Vitro*. 2010 Aug;24(5):1441-9.
122. Ou G, Baranov V, Lundmark E, Hammarstrom S, Hammarstrom ML. Contribution of intestinal epithelial cells to innate immunity of the human gut--studies on polarized monolayers of colon carcinoma cells. *Scand J Immunol*. 2009 Feb;69(2):150-61.
123. Madara JL, Stafford J. Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest*. 1989 Feb;83(2):724-7.
124. Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM, et al. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol*. 2003 Dec 1;171(11):6164-72.
125. Schmitz H, Fromm M, Bentzel CJ, Scholz P, Detjen K, Mankertz J, et al. Tumor

necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J Cell Sci.* 1999 Jan;112 (Pt 1):137-46.

126. Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, et al. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology.* 2005 Aug;129(2):550-64.

127. van Elburg RM, Uil JJ, Mulder CJ, Heymans HS. Intestinal permeability in patients with coeliac disease and relatives of patients with coeliac disease. *Gut.* 1993 Mar;34(3):354-7.

128. Schulzke JD, Bentzel CJ, Schulzke I, Riecken EO, Fromm M. Epithelial tight junction structure in the jejunum of children with acute and treated celiac sprue. *Pediatr Res.* 1998 Apr;43(4 Pt 1):435-41.

129. Lammers KM, Lu R, Brownley J, Lu B, Gerard C, Thomas K, et al. Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology.* 2008 Jul;135(1):194-204 e3.

130. Matysiak-Budnik T, Moura IC, Arcos-Fajardo M, Lebreton C, Menard S, Candalh C, et al. Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *J Exp Med.* 2008 Jan 21;205(1):143-54.

131. Lavo B, Knutson F, Knutson L, Sjoberg O, Hallgren R. Jejunal secretion of secretory immunoglobulins and gliadin antibodies in celiac disease. *Dig Dis Sci.* 1992 Jan;37(1):53-9.

132. Norderhaug IN, Johansen FE, Schjerven H, Brandtzaeg P. Regulation of the formation and external transport of secretory immunoglobulins. *Crit Rev Immunol.* 1999;19(5-6):481-508.

133. Moura IC, Centelles MN, Arcos-Fajardo M, Malheiros DM, Collawn JF, Cooper MD, et al. Identification of the transferrin receptor as a novel immunoglobulin (Ig)A1 receptor and its enhanced expression on mesangial cells in IgA nephropathy. *J Exp Med.* 2001 Aug 20;194(4):417-25.

134. Maki M, Aine L, Lipsanen V, Koskimies S. Dental enamel defects in first-degree relatives of coeliac disease patients. *Lancet*. 1991 Mar 30;337(8744):763-4.
135. Bergamaschi G, Markopoulos K, Albertini R, Di Sabatino A, Biagi F, Ciccocioppo R, et al. Anemia of chronic disease and defective erythropoietin production in patients with celiac disease. *Haematologica*. 2008 Dec;93(12):1785-91.
136. Halfdanarson TR, Litzow MR, Murray JA. Hematologic manifestations of celiac disease. *Blood*. 2007 Jan 15;109(2):412-21.
137. Arroyo HA, De Rosa S, Ruggieri V, de Davila MT, Fejerman N. Epilepsy, occipital calcifications, and oligosymptomatic celiac disease in childhood. *J Child Neurol*. 2002 Nov;17(11):800-6.
138. Sher KS, Mayberry JF. Female fertility, obstetric and gynaecological history in coeliac disease: a case control study. *Acta Paediatr Suppl*. 1996 May;412:76-7.
139. Brown JS, Jr. Celiac disease and schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2012 Sep;169(9):991-2.
140. Murray JA, McLachlan S, Adams PC, Eckfeldt JH, Garner CP, Vulpe CD, et al. Association Between Celiac Disease and Iron Deficiency in Caucasians, but Not Non-Caucasians. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013 Feb 13.
141. Ferguson A, Arranz E, O'Mahony S. Clinical and pathological spectrum of coeliac disease--active, silent, latent, potential. *Gut*. 1993 Feb;34(2):150-1.
142. Tursi A, Brandimarte G, Giorgetti G, Gigliobianco A, Lombardi D, Gasbarrini G. Low prevalence of antigliadin and anti-endomysium antibodies in subclinical/silent celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2001 May;96(5):1507-10.
143. Chand N, Mihas AA. Celiac disease: current concepts in diagnosis and treatment. *J Clin Gastroenterol*. 2006 Jan;40(1):3-14.
144. Arranz E, Bode J, Kingstone K, Ferguson A. Intestinal antibody pattern of coeliac disease: association with gamma/delta T cell receptor expression by intraepithelial lymphocytes, and other indices of potential coeliac disease. *Gut*. 1994

Apr;35(4):476-82.

145. McNeish AS, Harms HK, Rey J, Shmerling DH, Visakorpi JK, Walker-Smith JA. The diagnosis of coeliac disease. A commentary on the current practices of members of the European Society for Paediatric Gastroenterology and Nutrition (ESPGAN). *Arch Dis Child*. 1979 Oct;54(10):783-6.

146. Rostom A, Murray JA, Kagnoff MF. American Gastroenterological Association (AGA) Institute technical review on the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology*. 2006 Dec;131(6):1981-2002.

147. Walker MM, Murray JA, Ronkainen J, Aro P, Storskrubb T, D'Amato M, et al. Detection of celiac disease and lymphocytic enteropathy by parallel serology and histopathology in a population-based study. *Gastroenterology*. 2010 Jul;139(1):112-9.

148. Corazza GR, Villanacci V, Zambelli C, Milione M, Luinetti O, Vindigni C, et al. Comparison of the interobserver reproducibility with different histologic criteria used in celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007 Jul;5(7):838-43.

149. Trier JS. Diagnosis of celiac sprue. *Gastroenterology*. 1998 Jul;115(1):211-6.

150. Antonioli DA. Celiac disease: a progress report. *Mod Pathol*. 2003 Apr;16(4):342-6.

151. Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology*. 1992 Jan;102(1):330-54.

152. Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1999 Oct;11(10):1185-94.

153. Katz J, Kantor FS, Herskovic T. Intestinal antibodies to wheat fractions in celiac disease. *Ann Intern Med*. 1968 Dec;69(6):1149-53.

154. Ferfaglia G, Pulitano R, Sategna-Guidetti C. Do dietary antibodies still play a role in the diagnosis and follow-up of coeliac disease? A comparison among different

serological tests. *Panminerva Med.* 1995 Jun;37(2):55-9.

155. Chorzelski TP, Beutner EH, Sulej J, Tchorzewska H, Jablonska S, Kumar V, et al. IgA anti-endomysium antibody. A new immunological marker of dermatitis herpetiformis and coeliac disease. *Br J Dermatol.* 1984 Oct;111(4):395-402.

156. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med.* 1997 Jul;3(7):797-801.

157. Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem.* 2005 Dec;51(12):2415-8.

158. Routsias JG, Tzioufas AG, Moutsopoulos HM. The clinical value of intracellular autoantigens B-cell epitopes in systemic rheumatic diseases. *Clin Chim Acta.* 2004 Feb;340(1-2):1-25.

159. Yan SC, Grinnell BW, Wold F. Post-translational modifications of proteins: some problems left to solve. *Trends Biochem Sci.* 1989 Jul;14(7):264-8.

160. Gonzalez L, Boyle RW, Zhang M, Castillo J, Whittier S, Della-Latta P, et al. Synthetic-peptide-based enzyme-linked immunosorbent assay for screening human serum or plasma for antibodies to human immunodeficiency virus type 1 and type 2. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1997 Sep;4(5):598-603.

161. Gomara MJ, Haro I. Synthetic peptides for the immunodiagnosis of human diseases. *Curr Med Chem.* 2007;14(5):531-46.

162. Gevorkian G, Soler C, Viveros M, Padilla A, Govezensky T, Larralde C. Serologic reactivity of a synthetic peptide from human immunodeficiency virus type 1 gp41 with sera from a Mexican population. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1996 Nov;3(6):651-3.

163. Hernandez M, Beltran C, Garcia E, Fragoso G, Gevorkian G, Fleury A, et al. Cysticercosis: towards the design of a diagnostic kit based on synthetic peptides. *Immunol Lett.* 2000 Jan 10;71(1):13-7.

164. El Awady MK, El- Demellawy MA, Khalil SB, Galal D,

Goueli SA. Synthetic peptide-based immunoassay as a supplemental test for HCV infection. *Clin Chim Acta*. 2002 Nov;325(1-2):39-46.

165. Fachiroh J, Paramita DK, Hariwiyanto B, Harijadi A, Dahlia HL, Indrasari SR, et al. Single-assay combination of Epstein-Barr Virus (EBV) EBNA1- and viral capsid antigen-p18-derived synthetic peptides for measuring anti-EBV immunoglobulin G (IgG) and IgA antibody levels in sera from nasopharyngeal carcinoma patients: options for field screening. *J Clin Microbiol*. 2006 Apr;44(4):1459-67.

166. Yoshida CF, Rouzere CD, Nogueira RM, Lampe E, Travassos-da-Rosa MA, Vanderborcht BO, et al. Human antibodies to dengue and yellow fever do not react in diagnostic assays for hepatitis C virus. *Braz J Med Biol Res*. 1992;25(11):1131-5.

167. Morre SA, Munk C, Persson K, Kruger-Kjaer S, van Dijk R, Meijer CJ, et al. Comparison of three commercially available peptide-based immunoglobulin G (IgG) and IgA assays to microimmunofluorescence assay for detection of *Chlamydia trachomatis* antibodies. *J Clin Microbiol*. 2002 Feb;40(2):584-7.

168. Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum*. 2000 Jan;43(1):155-63.

169. Fleury A, Beltran C, Ferrer E, Garate T, Harrison LJ, Parkhouse RM, et al. Application of synthetic peptides to the diagnosis of neurocysticercosis. *Trop Med Int Health*. 2003 Dec;8(12):1124-30.

170. Mezo G, de Oliveira E, Krikorian D, Feijlbrieff M, Jakab A, Tsikaris V, et al. Synthesis and comparison of antibody recognition of conjugates containing herpes simplex virus type 1 glycoprotein D epitope VII. *Bioconjug Chem*. 2003 Nov-Dec;14(6):1260-9.

171. Kawasaki E, Yamaguchi H, Hattori H, Egashira T, Eguchi K. Autoantibodies to IA-2 in type 1 diabetes: measurements with a new enzyme-linked immunosorbent assay. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Apr;958:241-6.

172. Manocha M, Chitralekha KT, Thakar M, Shashikiran D, Paranjape RS, Rao DN. Comparing modified and plain peptide linked enzyme immunosorbent assay (ELISA)

for detection of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) and type-2 (HIV-2) antibodies. *Immunol Lett.* 2003 Feb 3;85(3):275-8.

173. Gomara MJ, Riedemann S, Vega I, Ibarra H, Ercilla G, Haro I. Use of linear and multiple antigenic peptides in the immunodiagnosis of acute hepatitis A virus infection. *J Immunol Methods.* 2000 Feb 3;234(1-2):23-34.

174. Perez T, Ercilla G, Chan WC, Haro I. Antigenicity of chimeric and cyclic synthetic peptides based on nonstructural proteins of GBV-C/HGV. *J Pept Sci.* 2006 Apr;12(4):267-78.

175. Sondergard-Andersen J, Lauritzen E, Lind K, Holm A. Covalently linked peptides for enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods.* 1990 Jul 20;131(1):99-104.

176. Poland WS. An analyst's slip of the tongue. *Psychoanal Q.* 1992 Jan;61(1):85-7.

177. Hernandez M, Selles ME, Pozo Pena L, Gomez I, Melchor A. Antigenicity of chimeric synthetic peptides based on HTLV-1 antigens and the impact of epitope orientation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Oct 5;276(3):1085-8.

178. Drakopoulou E, Uray K, Mezo G, Price MR, Vita C, Hudecz F. Synthesis and antibody recognition of mucin 1 (MUC1)-alpha-conotoxin chimera. *J Pept Sci.* 2000 Apr;6(4):175-85.

179. Davies JS. The cyclization of peptides and depsipeptides. *J Pept Sci.* 2003 Aug;9(8):471-501.

180. Weber-Mzell D, Kotanko P, Hauer AC, Goriup U, Haas J, Lanner N, et al. Gender, age and seasonal effects on IgA deficiency: a study of 7293 Caucasians. *Eur J Clin Invest.* 2004 Mar;34(3):224-8.

181. Fiore M, Pera C, Delfino L, Scotese I, Ferrara GB, Pignata C. DNA typing of DQ and DR alleles in IgA-deficient subjects. *Eur J Immunogenet.* 1995 Oct;22(5):403-11.

182. Wang N, Shen N, Vyse TJ, Anand V, Gunnarson I, Sturfelt G, et al. Selective

IgA deficiency in autoimmune diseases. *Mol Med*. 2011 Aug 4.

183. Hill ID, Dirks MH, Liptak GS, Colletti RB, Fasano A, Guandalini S, et al. Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2005 Jan;40(1):1-19.

184. Neuhausen SL, Steele L, Ryan S, Mousavi M, Pinto M, Osann KE, et al. Co-occurrence of celiac disease and other autoimmune diseases in celiacs and their first-degree relatives. *J Autoimmun*. 2008 Sep;31(2):160-5.

185. Tursi A, Giorgetti GM, Brandimarte G, Elisei W. High prevalence of celiac disease among patients affected by Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2005 Jul;11(7):662-6.

186. Yang A, Chen Y, Scherl E, Neugut AI, Bhagat G, Green PH. Inflammatory bowel disease in patients with celiac disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2005 Jun;11(6):528-32.

187. Farrace MG, Picarelli A, Di Tola M, Sabbatella L, Marchione OP, Ippolito G, et al. Presence of anti-"tissue" transglutaminase antibodies in inflammatory intestinal diseases: an apoptosis-associated event? *Cell Death Differ*. 2001 Jul;8(7):767-70.

188. Di Tola M, Sabbatella L, Anania MC, Viscido A, Caprilli R, Pica R, et al. Anti-tissue transglutaminase antibodies in inflammatory bowel disease: new evidence. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42(10):1092-7.

189. Holmes GK. Coeliac disease and Type 1 diabetes mellitus - the case for screening. *Diabet Med*. 2001 Mar;18(3):169-77.

190. Oyeyinka GO, Salimonu LS, Williams AI, Johnson AO, Ladipo OA, Osunkoya BO. Range of normal serum immunoglobulin (IgG, IgA and IgM) values in Nigerians. *Afr J Med Med Sci*. 1984 Sep-Dec;13(3-4):169-76.

191. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabo IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012

Jan;54(1):136-60.

192. Bourgey M, Calcagno G, Tinto N, Gennarelli D, Margaritte-Jeannin P, Greco L, et al. HLA related genetic risk for coeliac disease. *Gut*. 2007 Aug;56(8):1054-9.

193. Piccini B, Vascotto M, Serracca L, Luddi A, Margollicci MA, Balestri P, et al. HLA-DQ typing in the diagnostic algorithm of celiac disease. *Rev Esp Enferm Dig*. 2012 May;104(5):248-54.

194. Rubio-Tapia A, Kyle RA, Kaplan EL, Johnson DR, Page W, Erdtmann F, et al. Increased prevalence and mortality in undiagnosed celiac disease. *Gastroenterology*. 2009 Jul;137(1):88-93.

195. Troncone R, Auricchio R, Granata V. Issues related to gluten-free diet in coeliac disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2008 May;11(3):329-33.

196. Kupper C. Dietary guidelines and implementation for celiac disease. *Gastroenterology*. 2005 Apr;128(4 Suppl 1):S121-7.

197. Silvester JA, Rashid M. Long-term follow-up of individuals with celiac disease: an evaluation of current practice guidelines. *Can J Gastroenterol*. 2007 Sep;21(9):557-64.

198. Al-Toma A, Verbeek WH, Hadithi M, von Blomberg BM, Mulder CJ. Survival in refractory coeliac disease and enteropathy-associated T-cell lymphoma: retrospective evaluation of single-centre experience. *Gut*. 2007 Oct;56(10):1373-8.

199. Hadithi M, Pena AS. Current methods to diagnose the unresponsive and complicated forms of coeliac disease. *Eur J Intern Med*. 2010 Aug;21(4):247-53.

200. Walker MM, Murray JA. An update in the diagnosis of coeliac disease. *Histopathology*. 2011 Aug;59(2):166-79.

201. Catassi C, Fabiani E, Iacono G, D'Agate C, Francavilla R, Biagi F, et al. A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am J Clin Nutr*. 2007 Jan;85(1):160-6.

202. Pietzak MM. Follow-up of patients with celiac disease: achieving compliance

- with treatment. *Gastroenterology*. 2005 Apr;128(4 Suppl 1):S135-41.
203. Case S. The gluten-free diet: how to provide effective education and resources. *Gastroenterology*. 2005 Apr;128(4 Suppl 1):S128-34.
204. Alessio MG, Tonutti E, Brusca I, Radice A, Licini L, Sonzogni A, et al. Correlation between IgA tissue transglutaminase antibody ratio and histological finding in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012 Jul;55(1):44-9.
205. Di Domenico MR, Annaluisa S, Pluvio R, Iovine C, Rea F. [The role of anti-endomysium and anti-transglutaminase antibodies in the diagnosis and follow-up of celiac disease]. *Pediatr Med Chir*. 2002 May-Jun;24(3):208-12.
206. Comino I, Real A, Vivas S, Siglez MA, Caminero A, Nistal E, et al. Monitoring of gluten-free diet compliance in celiac patients by assessment of gliadin 33-mer equivalent epitopes in feces. *Am J Clin Nutr*. 2012 Mar;95(3):670-7.
207. Moron B, Cebolla A, Manyani H, Alvarez-Maqueda M, Megias M, Thomas Mdel C, et al. Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide. *Am J Clin Nutr*. 2008 Feb;87(2):405-14.
208. Bernardo D, Garrote JA, Nadal I, Leon AJ, Calvo C, Fernandez-Salazar L, et al. Is it true that coeliacs do not digest gliadin? Degradation pattern of gliadin in coeliac disease small intestinal mucosa. *Gut*. 2009 Jun;58(6):886-7.
209. Silano M, Dessi M, De Vincenzi M, Cornell H. In vitro tests indicate that certain varieties of oats may be harmful to patients with coeliac disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007 Apr;22(4):528-31.
210. Bernardo.D. Interacciones innato-adaptativas en el sistema inmune y su relacion con la patogenia de la enfermedad celiaca. Tesis doctoral, Universidad de Valladolid. 2008.
211. Ordiz DB. Interacciones innato-adaptativas en el sistema inmune y su relacion con la patogenia de la enfermedad celiaca. Tesis doctoral, Universidad de Valladolid. 2008.

212. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc.* 2006;1(2):581-5.
213. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.
214. Troeberg L, Nagase H. Zymography of metalloproteinases. *Curr Protoc Protein Sci.* 2004 Nov;Chapter 21:Unit 21 15.
215. Wilkesman J, Kurz L. Protease analysis by zymography: a review on techniques and patents. *Recent Pat Biotechnol.* 2009;3(3):175-84.
216. Leon.AJ. Marcadores inflamatorios en enfermedad celiaca, colitis ulcerosa y Enfermedad de Crohn 2006.
217. Clayburgh DR, Shen L, Turner JR. A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Lab Invest.* 2004 Mar;84(3):282-91.
218. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.
219. Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004 Jun;286(6):C1213-28.
220. Drago S, El Asmar R, Di Pierro M, Grazia Clemente M, Tripathi A, Sapone A, et al. Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scand J Gastroenterol.* 2006 Apr;41(4):408-19.
221. Clemente MG, De Virgiliis S, Kang JS, Macatagney R, Musu MP, Di Pierro MR, et al. Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut.* 2003 Feb;52(2):218-23.
222. Sander GR, Cummins AG, Henshall T, Powell BC. Rapid disruption of intestinal barrier function by gliadin involves altered expression of apical junctional proteins.

FEBS Lett. 2005 Aug 29;579(21):4851-5.

223. Lindfors K, Blomqvist T, Juuti-Uusitalo K, Stenman S, Venalainen J, Maki M, et al. Live probiotic *Bifidobacterium lactis* bacteria inhibit the toxic effects induced by wheat gliadin in epithelial cell culture. *Clin Exp Immunol*. 2008 Jun;152(3):552-8.

224. Barone MV, Gimigliano A, Castoria G, Paoella G, Maurano F, Paparo F, et al. Growth factor-like activity of gliadin, an alimentary protein: implications for coeliac disease. *Gut*. 2007 Apr;56(4):480-8.

225. Maiuri L, Ciacci C, Auricchio S, Brown V, Quarantino S, Londei M. Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology*. 2000 Oct;119(4):996-1006.

226. Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Cupelli F, Cinque B, Millimaggi D, Clarkson MM, et al. Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease. *Gut*. 2006 Apr;55(4):469-77.

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

228. Fehniger TA, Caligiuri MA. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood*. 2001 Jan 1;97(1):14-32.

229. Lahat N, Shapiro S, Karban A, Gerstein R, Kinarty A, Lerner A. Cytokine profile in coeliac disease. *Scand J Immunol*. 1999 Apr;49(4):441-6.

230. Lionetti P, Pazzaglia A, Moriondo M, Azzari C, Resti M, Amorosi A, et al. Differing patterns of transforming growth factor-beta expression in normal intestinal mucosa and in active celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1999 Sep;29(3):308-13.

231. Ulloa L, Doody J, Massague J. Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature*. 1999 Feb 25;397(6721):710-3.

232. Benahmed M, Meresse B, Arnulf B, Barbe U, Mention JJ,

- Verkarre V, et al. Inhibition of TGF-beta signaling by IL-15: a new role for IL-15 in the loss of immune homeostasis in celiac disease. *Gastroenterology*. 2007 Mar;132(3):994-1008.
233. Martin-Pagola A, Perez-Nanclares G, Ortiz L, Vitoria JC, Hualde I, Zaballa R, et al. MICA response to gliadin in intestinal mucosa from celiac patients. *Immunogenetics*. 2004 Nov;56(8):549-54.
234. Ciccocioppo R, Finamore A, Ara C, Di Sabatino A, Mengheri E, Corazza GR. Altered expression, localization, and phosphorylation of epithelial junctional proteins in celiac disease. *Am J Clin Pathol*. 2006 Apr;125(4):502-11.
235. Qiao SW, Iversen R, Raki M, Sollid LM. The adaptive immune response in celiac disease. *Semin Immunopathol*. 2012 Jul;34(4):523-40.
236. Mesin L, Sollid LM, Di Niro R. The intestinal B-cell response in celiac disease. *Front Immunol*. 2012;3:313.
237. Dorum S, Arntzen MO, Qiao SW, Holm A, Koehler CJ, Thiede B, et al. The preferred substrates for transglutaminase 2 in a complex wheat gluten digest are Peptide fragments harboring celiac disease T-cell epitopes. *PLoS One*. 2010;5(11):e14056.
238. Vader LW, de Ru A, van der Wal Y, Kooy YM, Benckhuijsen W, Mearin ML, et al. Specificity of tissue transglutaminase explains cereal toxicity in celiac disease. *J Exp Med*. 2002 Mar 4;195(5):643-9.
239. Osman AA, Gunnel T, Dietl A, Uhlig HH, Amin M, Fleckenstein B, et al. B cell epitopes of gliadin. *Clin Exp Immunol*. 2000 Aug;121(2):248-54.
240. Aleanzi M, Demonte AM, Esper C, Garcilazo S, Waggner M. Celiac disease: antibody recognition against native and selectively deamidated gliadin peptides. *Clin Chem*. 2001 Nov;47(11):2023-8.
241. Villalta D, Crovatto M, Stella S, Tonutti E, Tozzoli R, Bizzaro N. False positive reactions for IgA and IgG anti-tissue transglutaminase antibodies in liver cirrhosis are common and method-dependent. *Clin Chim Acta*. 2005 Jun;356(1-2):102-9.
242. Marai I, Shoenfeld Y, Bizzaro N, Villalta D, Doria A,

Tonutti E, et al. IgA and IgG tissue transglutaminase antibodies in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2004;13(4):241-4.

243. Bizzaro N, Villalta D, Tonutti E, Doria A, Tampona M, Bassetti D, et al. IgA and IgG tissue transglutaminase antibody prevalence and clinical significance in connective tissue diseases, inflammatory bowel disease, and primary biliary cirrhosis. *Dig Dis Sci*. 2003 Dec;48(12):2360-5.

244. Feighery L, Collins C, Feighery C, Mahmud N, Coughlan G, Willoughby R, et al. Anti-transglutaminase antibodies and the serological diagnosis of coeliac disease. *Br J Biomed Sci*. 2003;60(1):14-8.

245. Lock RJ, Stevens S, Pitcher MC, Unsworth DJ. Is immunoglobulin A anti-tissue transglutaminase antibody a reliable serological marker of coeliac disease? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2004 May;16(5):467-70.

246. Ciacci C, Cavallaro R, della Valle N, d'Argenio G. The use of serum tTG-ab assay in patients on gluten-free diet as a measure of dietetic compliance. *Gastroenterology*. 2002 Feb;122(2):588.

247. Kaukinen K, Sulkanen S, Maki M, Collin P. IgA-class transglutaminase antibodies in evaluating the efficacy of gluten-free diet in coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2002 Mar;14(3):311-5.

248. Morell A, Skvaril F, Nosedá G, Barandun S. Metabolic properties of human IgA subclasses. *Clin Exp Immunol*. 1973 Apr;13(4):521-8.

249. Giersiepen K, Lelgemann M, Stuhldreher N, Ronfani L, Husby S, Koletzko S, et al. Accuracy of diagnostic antibody tests for coeliac disease in children: summary of an evidence report. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012 Feb;54(2):229-41.

250. Parizade M, Shainberg B. Positive deamidated gliadin peptide antibodies and negative tissue transglutaminase IgA antibodies in a pediatric population: to biopsy or not to biopsy. *Clin Vaccine Immunol*. 2010 May;17(5):884-6.

251. Rashtak S, Ettore MW, Homburger HA, Murray JA. Comparative usefulness of deamidated gliadin antibodies in the diagnosis of celiac disease. *Clin Gastroenterol*

Hepatology. 2008 Apr;6(4):426-32; quiz 370.

252. Greenberg CS, Birckbichler PJ, Rice RH. Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J*. 1991 Dec;5(15):3071-7.

253. Leeds JS, Horoldt BS, Sidhu R, Hopper AD, Robinson K, Toulson B, et al. Is there an association between coeliac disease and inflammatory bowel diseases? A study of relative prevalence in comparison with population controls. *Scand J Gastroenterol*. 2007 Oct;42(10):1214-20.

254. Breen EG, Coghlan G, Connolly EC, Stevens FM, McCarthy CF. Increased association of ulcerative colitis and coeliac disease. *Ir J Med Sci*. 1987 Apr;156(4):120-1.

255. Melino G, Piacentini M. 'Tissue' transglutaminase in cell death: a downstream or a multifunctional upstream effector? *FEBS Lett*. 1998 Jun 23;430(1-2):59-63.

256. Fesus L, Davies PJ, Piacentini M. Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death. *Eur J Cell Biol*. 1991 Dec;56(2):170-7.

257. Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques*. 2005 Jan;38(1):73-83.