RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes

Universidad
Nacional
de Quilmes

Periolo, Natalia

Identificación de marcadores moleculares y celulares que puedan contribuir al pronóstico, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad celíaca

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:
Periolo, N. (2017). Identificación de marcadores moleculares y celulares que puedan contribuir al pronóstico, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad celíaca. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/288

Puede encontrar éste y otros documentos en: https://ridaa.unq.edu.ar

Universidad Nacional de Quilmes
Roque Sáenz Peña 352 // Bernal
Buenos Aires // Argentina
t.: (+41 11) 4365 7100
f.: (+54 11) 4365 7101
info@unq.edu.ar

Periolo, Natalia, Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto,
agosto de 2010, 137 p. ,
http://ridaa.unq.edu.ar,
Universidad Nacional de Quilmes, Secretaría de Posgrado,
Doctorado en Ciencias Básicas y Aplicadas

Identificación de marcadores moleculares y celulares que puedan contribuir al pronóstico, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad celíaca

TESIS DOCTORAL

Natalia Periolo

nataliaperiolo@hotmail.com

Resumen

La Enfermedad Celíaca (EC) es una enteropatía inducida por intolerancia al gluten, en individuos genéticamente susceptibles. Tras la activación de los linfocitos T del intestino delgado en respuesta a la gliadina, se ponen en marcha mecanismos inflamatorios que desregulan el balance entre citoquinas inflamatorias y citoquinas anti-inflamatorias como TGF-β e IL10. El resultado final es un predominio de la respuesta inmune de perfil Th1 mediado principalmente por la producción de INF- γ, y como se evidenció en los últimos años, con participación concomitante de una respuesta de tipo Th17. La gliadina, por otra parte, dispara la producción local de IL-15, que desempeña un papel central en el desencadenamiento de la respuesta inmune innata y adaptativa.

En la presente tesis investigamos una serie de moléculas de activación expresadas en los linfocitos T e indagamos principalmente el papel de CD30 y OX40, dos moléculas coestimulatorias que integran la súperfamilia del receptor de TNF (TNF-R). Evaluamos su modulación por citoquinas así como la capacidad de las subpoblaciones de LT periféricas, positivas para la expresión de dichas moléculas, de producir citoquinas relacionadas con el perfil Th1/Th2. Con el objetivo de comparar el comportamiento de estas moléculas en dos compartimientos diferentes, (periférico y local), como así también en niños y adultos se ha incluido en este estudio, sangre y biopsias de pacientes pediátricos y adultos con sus respectivos controles.

Nuestros resultados demuestran que la modulación de CD30 y OX40 está sujeta a la acción de IL-15 en blastos T, especialmente en pacientes celíacos. Observamos además, que la producción de INF-γ por parte de los blastos CD3+CD30+ es mayor que la producción de IL-4 en pacientes celíacos adultos con respecto a individuos control, y que estos últimos no presentan diferencias en cuanto a la producción de ambas citoquinas. Estos hallazgos nos indicarían que las células CD3+CD30+ periféricas podrían formar parte del proceso inflamatorio instaurado en esta patología, mediante su capacidad para producir INF-γ.

En lo que respecta a las biopsias duodenales, la estimulación con gliadina indujo un aumento en el número de células CD3+ que expresan CD30 en LPLs (Linfocitos de lámina propia) en pacientes celíacos pediátricos, pero no en adultos.

En cuanto a OX40, IL-15 no indujo la expresión de OX40 en blastos T; por el contrario, la expresión de esta molécula disminuyó en respuesta a la incorporación de esta citoquina. No hemos registrado diferencias en cuanto a la expresión de esta molécula ni en LIEs (Linfocitos intraepiteliales) ni LPLs, frente a la estimulación con gliadina en ninguno de los grupo de pacientes estudiados.

Por otro lado, hemos incorporado en este trabajo el estudio prospectivo de pacientes con Enfermedad Celíaca Refractaria (ECR), provenientes de una única institución. En ellos se llevaron a cabo una serie de estudios relacionados con aspectos clínicos, moleculares y celulares con el fin de establecer posibles correlaciones entre esos estudios y la incidencia al desarrollo de un curso más severo de esta enfermedad, como lo es el linfoma T asociado a Enteropatía (EATL). Respecto a los estudios convencionales, moleculares y celulares efectuados en los pacientes con ECR, cabe destacar que no hemos encontrado correlación entre la expresión de CD30 y el desarrollo de EATL, quizás debido al escaso número de pacientes que presentaron características severas de ECR.

En conclusión, en esta tesis se aportan los primeros datos que contribuyen a dilucidar la posible implicancia de CD30 y OX40 en el proceso inflamatorio asociado con la EC.

Futuras investigaciones deberán profundizar la comprensión de sus funciones biológicas a fin de asignar a dichas moléculas un papel concreto como marcadores moleculares asociados a la EC.

Lugar de trabajo: Laboratorio de Inmunogenética. Hospital de Clínicas “José de San Martín”.

A mi familia.

A Manuel,

Por tu amor, dulzura y

Por ser mi compañero incondicional….

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento en primer lugar a la Dra Alejandra Cherñavsky por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis, por sus correcciones, su apoyo, tolerancia y confianza en todos estos años.

A la Dra Graciela Glikman, por aceptar ser mi codirectora de tesis y apoyarme en todo momento.

Al Dr D Golombek, por ser mi consejero, y atender a mis consultas en un cerrar y abrir de ojos.

A mis compañeras del laboratorio: Laura, Nachi y Euge. Por acompañarme durante todos estos años y contenerme en cada momento en que lo necesité, por su ayuda a cambio de nada. Por los mates, los almuerzos, las discusiones (de todo tipo), por alegrarme el día en los momentos más complicados, porque hicieron estos años más fáciles, por sus observaciones en la corrección de la tesis, por los viajes a Congresos, por su paciencia!!!!.. mil gracias!!!!!!!!! Fue un placer para mí trabajar con uds, las quiero mucho.

Al Dr Arranz por concederme la posibilidad de realizar una pasantía en su laboratorio de Inmunología de las mucosas, Universidad de Valladolid. Gracias por su calidez y amabilidad. Al Dr Garrote y David que me trasmitieron su experiencia y sus conocimientos, por su buena disposición y por acompañarme en todo momento en cada uno de los experimentos. Por sus consejos!.

A toda la gente del lab, por los tres meses maravillosos que me hicieron sentir en la tierra madre que nunca voy a olvidar.

A la gente del Lab de Inmunogenética, las chicas de cultivo (Adri, Moni) por el asesoramiento en ensayos de cultivo y proliferación, gracias por darme siempre una mano.

A la gente del fondo, Lourdes, Ceci, Marcelo, por su colaboración en los ensayos de Elisa y cultivo.

Al Tucu, Ariel y Pachi, por enseñarme con toda la paciencia del mundo a usar el citómetro y pasarme miles de tubos todos estos años. Son unos genios, gracias.

A Nora, Ceci y Andrea por el asesoramiento en los primeros experimentos de citometría de flujo.

A Graciela por todo lo referente a experimentos de índole molecular y prestarme alguna Taq polimersa o el baño térmico.

A Gaby por su bondad y estar siempre predispuesta a la hora de conseguir muestras.

A las secretarias, Vero y Ana por atender siempre mis consultas administrativas. A

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Isabel, por ser divertida y ocurrente.

A Nely, Yoli y Marta por proveer el material estéril, las charlas y por el cafecito cuando llegaba muy temprano.

A Leo por sus charlas de pasillo y sus preguntas. Al laboratorio “Satz”.

A los doctores Julio Bai, Sonia Niveloni, Eduardo Mauriño y Hui del Hospital Udaondo, por las llamadas y mensajes que informaban la presencia de muestras y la paciencia en la recolección de los datos clínicos.

Al Dr Lucio Gonzáles del Hospital San Justo y la Dra Vilma Aliboni del Hospital Gutierrez, por proveernos muestras pediátricas.

Fundamentalmente a los pacientes (niños y adultos), que sin sus consentimientos hubiese sido imposible realizar este trabajo.

A mis amigas “de la facu”, que ya son mis amigas de la vida: Lety, Dany, Mari, Kari, Pili, Marina. Gracias por todos estos años de amistad, por la ayuda en lo profesional y personal, por las risas, peleas, enojos, pero sobre todo, por la alegría que sentimos al estar juntos, gracias por todos estos años.

A mis amigas de la infancia Glenda, que aunque ya no somos más vecinas seguimos compartiendo a la distancia la amistad tan vigente de estos 25 años.

A mi amiga Moi por sus consejos, ser compinche y por nuestros cafecitos en las Lomitas.

A mis abuelas, Elsa y Iaia, por su amor, ternura y cariño de todos estos años.

A mi padre, mi madre y hermana por sus consejos, amor incondicional y por ser mi contención en todo momento de mi vida. Gracias!!!!

A Manuel, por despertarme cada mañana con una sonrisa y darme fuerza en todo momento, por comprender mis estados de ánimo y acompañarme con su paciencia y tolerancia en cada instante. Por hacer especial cada uno de mis días, por ser la razón de mi felicidad. No podía olvidarme de darle las gracias por su ayuda en el diseño gráfico de mis presentaciones a Congresos y en la tesis.

Y por último, a todas aquellas personas que de alguna u otra forma ayudaron, motivaron y se pusieron felices por los logros obtenidos en estos años.

A todos ellos

Muchas Gracias!!!!

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

ABREVIATURAS
INTRODUCCIÓN
1-ENFERMEDAD CELÍACA (EC)
1.1 Definición y características generales
1.2 Prevalencia de la EC
1.3 Manifestaciones clínicas en niños y adultos
1.4 Enfermedades Asociadas
1.5 Diagnóstico: Criterios Serológicos e Histológicos
1.6 Factores Genéticos y Ambientales

2-CARACTERÍSTICAS DEL SISTEMA INMUNE DE MUCOSAS EN LA EC

2.1 Características generales de los tejidos linfoides asociados a intestino
2.2 Placas de Peyer
2.3 Nódulos linfáticos mesentéricos
2.4 Poblaciones linfocitarias presentes en la mucosa del ID
LIEs
LPLs

3-RESPUESTA INMUNE FRENTE A ANTÍGENOS DIETARIOS

3.1 Mecanismos de Tolerancia Oral
3.2 Síntesis de Inmunoglobulina A
3.3 Reactividad frente al gluten
3.4 Gliadina: Pépidos tóxicos y péptidos inmunogénicos
3.5 Transglutaminasa tisular: Implicancias en la EC
3.6 Perdida de la tolerancia oral al gluten en la EC

4-MECANISMOS INMUNOLÓGICOS DE LA EC

4.1 Respuesta inmune innata
4.2 Respuesta inmune adaptativa
4.3 Características y funciones de IL-15 y su receptor
4.4 El papel de IL-15 en la EC
4.5 Otras citoquinas involucradas en la EC

5-ENFERMEDAD CELIACA REFRACTARIA (ECR)

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

5.1 Definición, Clasificación y Tratamiento
5.2 La cadena γ del receptor antigénico de los LT (TCR-γ) y su relación con el inmunofenotipo
5.3 Linfoma T Asociado a Enteropatía (EATL): Definición y Clasificación
5.4 ECR: como puente entre la EC clásica y EATL

6-DESCRIPCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LA SUPERFAMILIA DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF) Y SUS RECEPTORES (TNF-R)

6.1 Súperfamilia de TNF
6.2 Súperfamilia de TNF-R
6.3 Vías de señalización a través de la familia de TNF-R
6.4 Moléculas coestimulatorias CD30 y OX40
CD30: Características, funciones y vías de señalización celular
OX40: Características, funciones y vías de señalización celular
6.5 Implicancias de CD30 y OX40 en la EC y la ECR

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1-PACIENTES

1.1 Obtención de Muestras Biológicas
Sangre
Biopsias duodenales

2-TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR

2.1 Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)
Cultivo y estimulación mitogénica de CMSP
Estimulación de CMSP utilizando citoquinas
Ensayo de proliferación celular
Inmunomarcación por Citometría de flujo (CF)
Antígenos de superficie
Antígenos intracitoplasmáticos
Producción de INF-γ e IL-4 mediante el ensayo de ELISA
2.2 Estudios en biopsias duodenales
Cultivo de biopsias con gliadina e IL-15
Obtención de LIEs y LPLs
Estudio Inmunohistoquímico

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

3-TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.1 Obtención de ADN de sangre periférica
3.2 Purificación de ARN a partir de tejidos
3.3 Aislamiento de ADN plasmídico
3.4 Retrotranscripción
3.5 Amplificación de citoquinas IL-15, INF e IL-18 por RT-PCR semi-cuantitativa
3.6 Cuantificación de β-actina
3.7 Normalización de resultados
3.8 Obtención de ADN para estudios de clonalidad en biopsias
3.9 Análisis del TCR γδ por PCR

4-ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

5-CONSIDERACIONES ÉTICAS

RESULTADOS

1-Marcadores de activación celular en células mononucleares de sangre periférica (CMPS)
1.1 Aislamiento de CMPS
1.2 Expresión marcadores de activación CD45RO, CD25, CD30 y OX40 en CMSP: condición basal
1.3 Expresión de los marcadores de activación CD45RO, CD25, CD30 y OX40 luego de la activación mitogénica con anti-CD3
1.4 Caracterización fenotípica de las subpoblaciones CD3+CD30+ y CD3+OX40+
1.5 Estudios de proliferación celular
1.6 Modulación de CD30 y OX40 por IL-15 en blastos T activados
1.7 Modulación de CD30 y OX40 por IL-2 en blastos T activados
1.8 Cuantificación de INF- γ e IL-4 en sobrenadante de cultivos de blastos T activados
1.9 Detección intra-citoplasmática de INF-γ e IL-4 en blastos CD3+CD30+ y CD3+OX40+
Resumen de Resultados
Discusión de Resultados

2-Marcadores de activación celular en biopsias de la mucosa intestinal
2.1 Análisis por inmunohistoquímica de la expresión de CD30 en la mucosa duodenal.
2.2 Cultivo de biopsias duodenales
2.2.1 Expresión basal de moléculas de activación en LIEs y LPLs: CD25, CD69, CD45RO, CD30 y OX40
2.2.2 Efecto de la gliadina sobre la expresión de moléculas de activación en LIEs y LPLs:

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

CD25, CD69, CD45RO, CD30 y OX40
2.2.3 Modulación de CD30 por IL-15 en LIEs y LPLs
Resumen de Resultados
Discusión de Resultados

3-ECR: Parámetros clínicos, moleculares y celulares asociados con el pronóstico y su evolución
3.1 Estudio molecular de TCR-γ y su relación con el inmunofenotipo
3.2 Evolución de la ECR: Tasa de sobrevida y causas de muerte
3.3 Expresión de citoquinas IL-15, IL-18 e INF-γ en biopsias duodenales
3.4 Análisis de la expresión de CD30 en LIEs y LPLs frente al IL-15
3.5 EATL en pacientes con ECR
Resumen de Resultados
Discusión de Resultados

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

BIBLIOGRAFÍA

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Introducción

1- ENFERMEDAD CELÍACA

1.1 Definición y características generales

La enfermedad celíaca (EC) es una patología autoinmune que se desencadena por la ingestión de gluten y sus proteínas homólogas en avena (avenina), trigo (gliadina), cebada (hordeina) y centeno (secalina). La fracción responsable de la acción deletérea del gluten es la prolamina, gliadina, la cual conduce a una intolerancia intestinal permanente en individuos genéticamente susceptibles portadores de los genes HLA-DQ2 y en menor medida de HLA-DQ8 (Sollid LM y Thorsby, 1993).

La EC se caracteriza por la presencia de lesiones en la mucosa del intestito delgado (ID) desencadenadas por péptidos de gliadina, acompañadas por al aumento de LIEs (80-100 LIEs / 100 enterocitos, unas cuatro veces más que en la mucosa no celíaca).

En lo que respecta al seguimiento de aquellas personas que padecen la enfermedad, el único tratamiento es mantener una dieta libre de gluten (DLG) de por vida. En la mayoría de los pacientes celíacos, el cumplimiento estricto de la DLG conduce, en pocos meses, a la recuperación de la función y arquitectura normal de la mucosa del ID, así como a la remisión de los síntomas y la normalización de los parámetros serológicos. En caso contrario, se incrementa el riesgo de aparición de linfomas y mortalidad. Con frecuencia la enfermedad se asocia con alteraciones óseas, gineco-obstétricas y otras enfermedades autoinmunes que afectan aproximadamente al 20 por ciento de los pacientes adultos (Cosnes y col., 2008), y neoplasias malignas como los EATL. Estos linfomas se desarrollan como consecuencia de la activación descontrolada de los LIEs y provocan una enteropatía grave refractaria a la DLG (Cellier y col., 2000; Spencer y col., 1988).

Todavía no está claro por qué sólo algunos individuos portadores de las moléculas HLA de riesgo desarrollan la enfermedad, y por qué algunos lo hacen en la infancia cerca de su primer exposición al gluten, mientras que otros la desarrollan mucho más tarde en la edad adulta, como tampoco cuáles son los mecanismos que conducen a complicaciones extra- digestivas.

Los enterocitos de la mucosa duodenal humana expresan un receptor para quimioquinas, CXCR3, que a su vez funciona como receptor para la gliadina. La interacción entre la gliadina y CXCR3 promueve un aumento de la permeabilidad de la barrera intestinal y favorece el ingreso masivo de esta proteína desde el lumen del ID. Este ingreso masivo de gliadina contribuye a exacerbar tanto la respuesta innata como a disparar una respuesta adaptativa (Lammers KM y col., 2008).

La respuesta a gliadina involucra linfocitos T (LT) y B (LB), células natural killer (NK), monocitos, células dendríticas, como así también, la producción de citoquinas, factores de

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

crecimiento y quimioquinas que potencian la respuesta y conducen al aplanamiento y reducción de la superficie de absorción del ID. Los primeros eventos se inician en la lámina propia (LP) luego que los péptidos de gliadina incrementan su capacidad antigénica por acción de la tTG, producida por fibroblastos, células inflamatorias y endoteliales tras un daño tisular. Se identificó a la transglutaminasa tisular (tTG) como el autoantígeno más importante, aunque no el único que es reconocido por los anticuerpos antiendomisio (EMA) (Dieterich W y col., 1997).

1.2 Prevalencia de la EC

El descubrimiento de métodos para de detección de anticuerpos serológicos específicos y los de biopsia intestinal desempeñaron un papel fundamental en la estimación de la incidencia y prevalencia de la celiaquía. Se estima que la misma, a nivel mundial, es de 1:3.300 según el diagnóstico clínico, y de 1:266 según los marcadores serológicos (González L, 2004). Dadas las diversas manifestaciones de esta enfermedad, es muy difícil precisar los valores reales de incidencia y prevalencia. La EC se describe casi exclusivamente en sujetos de raza blanca siendo rara su presencia en raza amarilla o negra. Es mucho más frecuente en Caucásicos del Norte y Sur de Europa.

Un estudio realizado en adultos de la provincia de Buenos Aires y sus alrededores indica que la prevalencia de la EC es de 1 de cada 167 individuos sanos, de los cuales el 70 % no había presentado sintomatología previa (Gomez JC y col., 2001).

1.3 Manifestaciones clínicas en niños y adultos

Todavía no está claro por qué algunos individuos desarrollan la enfermedad en la infancia, después de su primer exposición al gluten, mientras que otros la desarrollan mucho más tarde en la edad adulta.

En Niños:

La EC se manifiesta principalmente entre los 4 y los 24 meses de edad, al suspender la lactancia materna e incorporar la dieta con gluten. Los síntomas clínicos más comunes son diarreas, distensión abdominal, vómitos y retraso en el crecimiento. La enfermedad puede incluir anemias por deficiencia en ácido fólico, osteoporosis, deficiencias de vitamina K. También existen formas denominadas atípicas, de menor expresividad clínica en la que las manifestaciones digestivas están ausentes u ocupan un segundo lugar.

En Adultos:

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

La EC se diagnostica en una proporción de 1 niño: 9 adultos. El diagnóstico en adultos se realiza entre los 30 y los 50 años, con un 20% de casos presentes en mayores de 65 años (van Heel DA y West J, 2006), probablemente en relación con una mayor prevalencia de enfermedades autoinmunes tales como osteosporosis o anemia ferropénica.

Trabajos publicados en los últimos veinte años demuestran que las manifestaciones clínicas de la EC han cambiado. Las manifestaciones intestinales clásicas o típicas (malabsorción y diarreas) ya no son tan frecuentes (Dewar DH y Ciclitira 2005; Hernández L y Green PH, 2005; Sanders DS y col., 2003; Riesta S y col., 1999; Sanders DS y col., 2002). Los síntomas gastrointestinales atípicos, como el dolor abdominal, flatulencia o el síndrome de intestino irritable (Sanders DS y col., 2001; Wahnschaffe U y col., 2001) se describen cada vez con mayor frecuencia. En los últimos años, se han demostrado formas ocultas de la enfermedad tanto para los pacientes pediátricos como adultos que han dado lugar a la comparación de esta enfermedad con un iceberg. En esta representación, las formas sintomáticas (tanto típicas como atípicas) serían solo la parte visible del iceberg.

En la figura 1 se esquematiza las formas sintomáticas tanto típicas como atípicas que serían solo la parte visible del iceberg, y aparecen definiciones nuevas, constituyendo un nuevo espectro clínico de esta enfermedad, que incluye la EC silente, latente y potencial (Ferguson y col. , 1993).

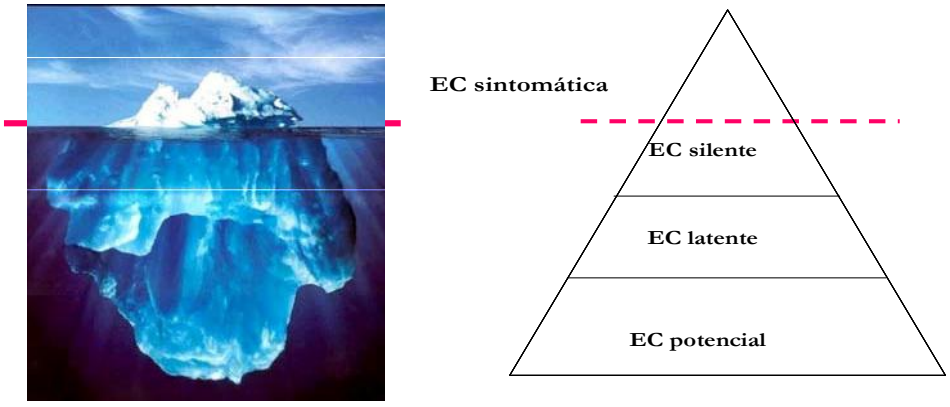


Figura 1. Las formas sintomáticas (tanto típicas como atípicas) serían sólo la parte visible del *iceberg*.

Formas silentes: Son pacientes asintomáticos en los que la atrofia de las vellosidades y/o la serología positiva se demuestran a partir de un familiar diagnosticado o en estudios poblacionales (Troncone R, 1995). Estos individuos suelen presentar también el marcador de histocompatibiliadad HLA-DQ2/8. Esta forma corresponde a gran parte de los adultos con diagnóstico de EC en la infancia que no sigue la DLG (Tursi A y col., 2001; Matysiak-Budnik T y col., 2007).

Formas latentes: Pacientes celíacos que a pesar de estar ingiriendo gluten no presentan sintomatología clínica y tienen una biopsia yeyunal normal o solo aumento de los LIEs. Presentan atrofia de las vellosidades intestinales, con normalización histológica tras la eliminación del gluten de la dieta, y reaparición de la lesión al reintroducirlo nuevamente. Formas potenciales: Pacientes sin alteraciones histológicas en la biopsia intestinal, pero presentan algún marcador positivo propio de la EC o un aumento de los LIEs (Eiras P y col., 2002). En ocasiones también son HLA-DQ2/8. Se especula que pueden desarrollar potencialmente EC, que podría estar inducida por factores ambientales no identificados hasta el momento (Kemppainen T y col., 1999; Arranz y col. , 1994).

1.4 Enfermedades Asociadas

Se ha observado que los pacientes con EC tienen una especial predisposición a padecer otras enfermedades de base inmunológica. Una posible explicación es que la EC y otros trastornos compartieran algún mecanismo patogénico aunque éstos todavía no han sido completamente aclarados. Se ha demostrado la importancia de la duración de la exposición al gluten en los individuos susceptibles, observando que en niños con diagnóstico tardío, el riesgo de manifestar una enfermedad autoinmune aumentaba de 3,3% en los diagnosticados antes del año de vida, hasta el 26,3% en aquellos diagnosticados después del tercer año de vida (Ventura A, 1999). Es posible que la estimulación linfocitaria crónica durante la EC actúe como detonante de otras enfermedades autoinmunes graves. Una de las enfermedades más comunes relacionadas con la EC es la dermatitis herpetiforme que cursa con lesiones dérmicas y encefalopatía progresiva. La tabla 1 resumen las enfermedades asociadas a la EC (autoinmunes, neurológicas y otras).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Enfermedades Asociadas	Trastornos neurológicos y psiquiátricos
Enfermedades Autoinmunes	
Dermatitis herpetiforme	Encefalopatía progresiva
Diabetes tipo I	Síndromes cerebelosos
Déficit selectivo de IgA	Demencia con atrofia cerebral
Tiroiditis	Leucoencefalopatía
Enfermedad inflamatoria intestinal	Epilepsia y calcificaciones
Síndrome de Sjögren	
Lupus eritematoso diseminado	**Otras asociaciones**
Enfermedad de Addison	Síndrome de Down
Nefropatía de IgA	Fibrosis quística
Hepatitis crónica	Síndrome de Turner
Cirrosis biliar primaria	Síndrome de Williams
Artritis rematoidea	Enfermedad de Hartnup
	Cistinuria

Tabla 1: Enfermedades asociadas a la EC.

1.5 Diagnóstico: Criterios Serológicos y Histológicos

El diagnóstico de la EC se establece mediante análisis clínicos, serológicos e histopatológicos, sumados a una buena respuesta a la DLG. No obstante, la biopsia endoscópica sigue constituyendo la clave diagnóstica de la enfermedad (Trier JS, 1998; Murray JA y Green, 1999). En el pasado, la EC era diagnosticada mayoritariamente después de su presentación clínica. Hoy en día, muchos más pacientes son referidos en base a la positividad de pruebas serológicas. La endoscopia y biopsia duodenal (sin sospecha previa de enfermedad celíaca) también llevan al diagnóstico.

Criterios Histológicos.

La clasificación de Marsh es una clasificación precisa de la lesión intestinal tanto en el diagnóstico inicial como en el seguimiento (Marsh, 1986; Marsh, 1989 y Marsh 1990). Según su esta clasificación se distinguen distintos estadíos de daño en el ID, figura 2.

La clasificación se divide en:

Marsh 1 (estadio infiltrativo): se caracteriza por una mucosa con arquitectura normal que presenta un incremento significativo de LIEs. Esta fase no es diagnóstica de la enfermedad.

Marsh 2 (estadio hiperplásico): presenta una arquitectura vellositaria normal, con incremento de LIEs y con hiperplasia críptica.

Marsh 3 (estadio destructivo): son lesiones diagnósticas de EC.

- Tipo 3a: atrofia vellositaria leve.
- Tipo 3b: atrofia vellositaria marcada.
- Tipo 3c: Mucosa plana (atrofia vellositaria total).

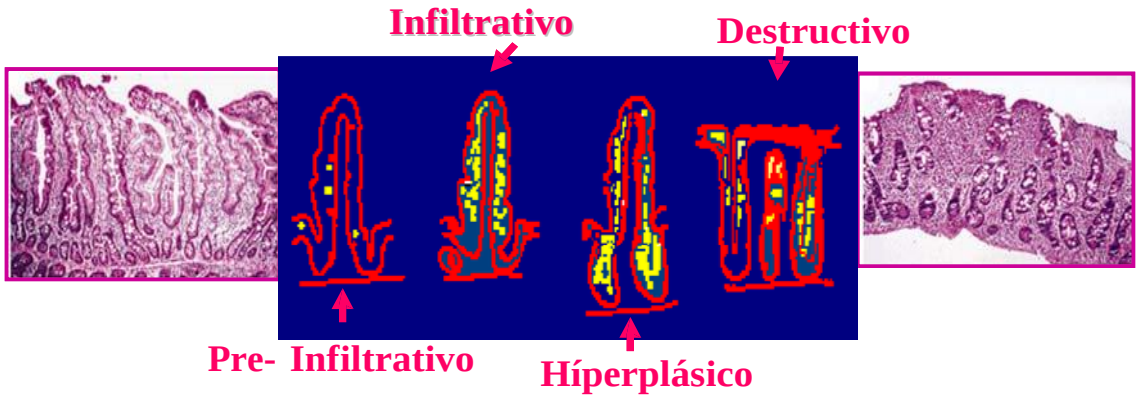


Figura 2: Diferentes estadíos del daño en la mucosa intestinal.

Criterios Serológicos.

La presencia de diferentes tipos de anticuerpos séricos en el momento del diagnóstico y su desaparición concomitante con la DLG complementan el análisis de la biopsia. Estos anticuerpos son específicos de gliadina, reticulina, endomisio o tTG.

Anticuerpos anti-gliadina (AGA).

Las gliadinas son proteínas (del grupo de las prolaminas) presentes en el gluten (Paulley JW, 1954). En 1958 se describe, por primera vez, la presencia de anticuerpos aglutinantes de gluten en suero de pacientes celíacos (Berger, 1958). La determinación de AGA se adoptó en el año 1981 y actualmente se realiza mediante ELISA. Si bien estos anticuerpos (de isotipos IgA o IgG) son moderadamente sensibles, no son específicos de la enfermedad e incluso se pueden detectar a bajos niveles en suero normal. En la actualidad se utilizan para monitorear transgresiones de la dieta y en pacientes menores de 2 años, IgA-AGA sigue siendo utilizado como marcador serológico (Peter JS, 1996).

Anticuerpos anti-reticulina (ARA).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Los ARA son anticuerpos no-órgano específicos que pueden ser asociados a múltiples patologías. Según el patrón de reconocimiento de tejido conectivo sobre secciones de tejido congelado de riñón e hígado de rata, los ARA se clasifican en 5 subtipos (R1, R2, Rs, R3 y R4).El patrón de reconocimiento de las fibras del tejido conectivo peritubular y periglomerular de los anticuerpos ARA IgA R1es el específico de la EC y de la DH. Éstos tienen una especificidad cercana a 100%, pero la complicada interpretación de los patrones y su baja sensibilidad hacen inadecuada su utilización.

Anticuerpos (EMA).

La presencia de anticuerpos séricos IgA EMA en enfermos celíacos se observó por primera vez en 1983. Su determinación se hace por inmunofluorescencia indirecta sobre cortes de tejido de esófago de mono o de cordón umbilical humano. Superan a los AGA en sensibilidad (85-98%) y especificidad (97-100%).

Anticuerpos anti- tTG.

En 1997 se encontró que el autoantígeno reconocido por los anticuerpos EMA es la tTG (Dieterich W y col., 1997). Los niveles de ac anti-tTG pueden ser muy bajos o indetectables en caso de que la atrofia sea muy leve. Si bien es difícil obtener falsos negativos, estos pueden presentarse en pacientes con menos de 2 años o con déficit de IgA. Pacientes con una deficiencia en IgA tienen un riesgo 10 veces superior de tener la enfermedad (Maki M y Collin P, 1997). Ocasionalmente pueden aparecer casos de celiaquía en pacientes con hipogamaglobulinemia y/o asociados a una deficiencia de IgA. En estos casos se deben determinar anticuerpos de isotipo IgG. Estos anticuerpos desaparecen cuando se suspende la ingesta de gluten.

1.6 Factores Genéticos y Ambientales

Factores Genéticos.

La EC es una alteración condicionada genéticamente por la presencia del héterodímero DQ2 del sistema HLA clase II (Solid LM, 1989; Sollid LM y Thorsby, 1993) constituída por los alelos DQA1* 05 y DQB1* 02, o por la proteína DQ8 (5-10 % de los pacientes), codificada por los alelos DQA1 * 0301 y DQB1 *0302. Estos alelos están ubicados en cis dentro del haplotipo DR3-DQ2 (DQB1* 0201/ DQA1* 0501/ DRB1* 0301) o en trans, en el genotipo héterocigota DR5-DQ7 / DR7-DQ2, figura 3. El héterodímero DQ2 está presente en la cuarta parte de la población general, que concentra más del 90% de

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

los pacientes con EC.

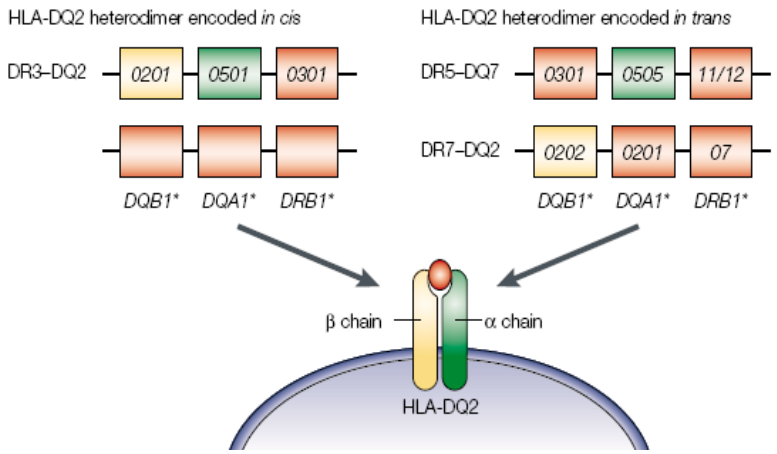


Figura 3: HLA-DQ2 asociado a la EC.

Existen otros genes fuera del sistema HLA que también ejercen una importante contribución a la carga genética asociada a la enfermedad (Diosdado B y col., 2005).

Factores Ambientales.

El gluten es el principal factor desencadenante de la EC, especialmente cuando la introducción de estas proteínas se realiza muy pronto en la vida del niño, y la cantidad ingerida durante en primer año de vida podría tener un valor determinante (Ivarsson A y col., 2000). Otros factores incluyen infecciones y duración de la lactancia materna. La contribución de las infecciones podría reflejarse en las variaciones estacionales observadas respecto a la aparición de la enfermedad, quizá debido a que la suspensión de la lactancia materna se realiza en invierno, cuando es más frecuente sufrir infecciones (Ivarsson A y col. , 2003).La lactancia materna tiene ventajas de tipo inmunológico, además de prevenir frente a las infecciones. El consumo temprano de gluten es un factor de riesgo importante. Se determinó tanto una introducción muy precoz de los cereales que contienen gluten en la dieta (inferior a 3 meses) como muy tardía (superior a los 7 meses) incrementan el riesgo de EC, y el desarrollo de autoinmunidad relacionada con la EC (Norris JM y col. , 2005).

2- CARACTERÍSTICAS DEL SISTEMA INMUNE DE MUCOSAS EN LA EC

2.1 Características generales de los tejidos linfoides asociados a intestino

El sistema inmunológico de mucosas está compuesto por los tejidos linfoides asociados con las superficies mucosas (MALT) y comprende los tejidos linfoides asociados

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

al intestino (GALT) a bronquios (BALT), a la mucosa nasofaríngea (NALT), a las glándulas mamarias y salivales, y a los órganos génito-urinarios (Kelsall y Strober 1996).

Particularmente, el GALT es extremadamente complejo ya que además de enfrentarse con la mayor cantidad y variedad de antígenos, debe discriminar a los microorganismos patógenos, diferenciándolos de la abundante flora comensal y antígenos inocuos propios de las proteínas de la dieta. Por lo tanto la mucosa intestinal constituye un sitio de altísima actividad inmunitaria que comprende el mayor número de LT, LB y macrófagos del organismo (McGhee y col., 1992). En la mucosa intestinal se establece una modulación fina de la respuesta inmune, cuyo principal objetivo es la inducción de tolerancia local y sistémica contra antígenos inocuos y la vigilancia frente a microorganismos patógenos.

El GALT está integrado por las Placas de Peyer (PP), agregados linfoides macroscópicos que se encuentran en la submucosa a lo largo de todo el ID, los nódulos linfáticos mesentéricos (NLM), los LIEs y los LPLs. Estos componentes definen dos compartimientos funcionales diferentes según su papel dentro de la respuesta inmune: uno de inducción de la respuesta (PP y NLM) y otro constituído por el epitelio y en la lámina propia (LP) donde se lleva a cabo la respuesta efectora mediada por los LPLs y LIEs (Mowat AM, 2003).La conexión entre sitios y inductores y efectores se describe en la figura 4.

2.2 Placas de Peyer

Las PP se encuentran en la submucosa a lo largo de todo ID. Las PP maduras consisten en la acumulación de grandes folículos de células B y áreas intermedias de células T. Éstas se diferencian del resto de los nódulos linfáticos en que no tienen vasos linfáticos aferentes. Esta característica se corresponde con el hecho de que el antígeno se toma del lumen intestinal a través del epitelio (Croitoru y Bienenstock, 1994).

2.3 Nódulos linfáticos mesentéricos

Los NLM son los nódulos linfáticos más grandes del organismo. La acumulación de linfocitos en los NLM requiere L-selectina e integrina α4β7, moléculas de adhesión que normalmente están implicadas en la migración de los linfocitos a tejidos periféricos y a mucosa respectivamente. Debido a estas características, se puede considerar a los NLM como un cruce entre las vías de recirculación periférica y de mucosas (Mowat, 2003).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

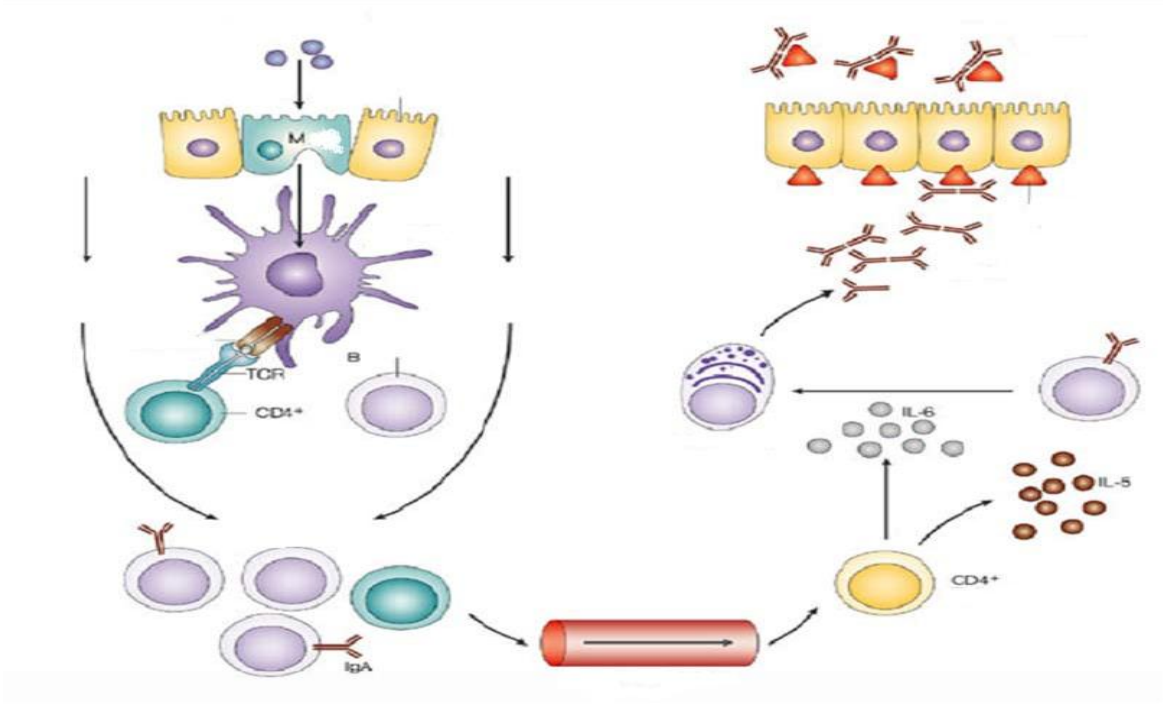


Figura 4. Sitios Inductores y efectores en la mucosa.

El primer paso en la inducción de una respuesta inmunológica de mucosas es el transporte de antígenos a través de la barrera epitelial. Después del procesamiento y presentación de antígenos en los sitios de inducción, los blastos B específicos de antígeno proliferan localmente y migran vía sanguínea hacia tejidos secretores y mucosas locales y distantes. La IgA, dimérica o polímerica, es transportada a través de las células epiteliales en secreciones glandulares y mucosas vía transcitosis mediada por receptor (Apodaca y col., 1991).

2.4 Poblaciones linfocitarias presentes en la mucosa del ID

Los elementos linfoides menos organizados asociados con la mucosa intestinal, incluyen los LIEs como los LPLs, figura 5.

LIEs

Los LIEs son una población de células T adheridas a la superficie basolateral de los enterocitos, delimitada por el núcleo de la célula epitelial y la lámina basal. El papel de los LIEs ha sido asociado a una función supresora y de vigilancia inmunológica frente a células infectadas y/o tumorales. Algunos subtipos de LIEs participarían además en la homeostasis y en la reparación del epitelio mediante la secreción del factor de crecimiento de queratinocitos. Además de este papel funcional, casi todos los LIEs, sea cual fuese su fenotipo de superficie expresan la integrina αEβ7 (CD103), cuyo ligando es la E-cadherina

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

epitelial. Las interacciones entre αEβ7 y E-cadherina ayudan a anclar los LIEs al epitelio (Farstad y col., 1996, MacDonald, 2003). El incremento de los LIEs es el primer y más sensible hallazgo inducido por el gluten en la mucosa del intestino y constituye por sí solo la característica histopatológica mas revelante (Maki M y Collin P, 1997). Este incremento es de 80 LIEs por cada 100 células epiteliales mientras que en condiciones normales se encuentran en una relación de 10 - 30 LIEs / 100 enterocitos (Ferguson A, 1977). El aumento en el porcentaje de LIEs en el epitelio se debe en parte a un aumento en la proliferación de LIEs αβ y γδ (Halstensen TS y Brandtzaeg, 1993) y en parte a una reducción de las células epiteliales en el estadio de acortaminto vellositario (Camarero C y col., 2000). Mientras que el aumento de los LIEs αβ se correlaciona con la actividad de la EC y se normaliza con una dieta en DLG, el aumento de los LIEs γδ permanece constante en términos relativos: mientras estas células suponen un 10% de todos los LIEs en la mucosa intestinal sana, representan aproximadamente un 25% en la mucosa celíaca en todas las fases de la enfermedad. Además, el aumento de LIEs γδ se observa en todas las fases de la enfermedad, lo que hace que este parámetro sea muy útil en el diagnostico de las formas potenciales y latentes. La mayor densidad de LIEs no es exclusiva de la EC, ya que también se observa incrementado en la mucosa de pacientes con Dermatitis Herpetiforme y distintas enteropatías crónicas asociadas a infecciones virales o bacterianas. Sin embargo, en la mayoría de los pacientes con estos procesos el aumento de LIEs γδ suele ser transitorio y moderado. Los LIEs presentan una subpoblación heterogénea de LT (Chott A y col., 1992) que se encuentran en contacto con células epiteliales y tiene importancia en la respuesta a antígenos en la mucosa del ID (Mahadeva S y col 2002). Más del 95% de lo LIEs son CD3+CD2+ y proximadamente un 70-80% son CD8+. Los LIEs expresan aproximadamente un 3% de CD25 y la mayoría expresa CD69 y CD45RO (Eiras P y col., 1998) y no expresan HLA-DR (Halstensen TS y Brandtzaeg, 1993).

LPLs

La LP es la capa de tejido conjuntivo existente entre el epitelio y la muscularis mucosa constituída por células de músculo liso, fibroblastos, vasos sanguíneos y vasos linfáticos (MacDonald y Spencer, 1994). La LP del ID y del intestino grueso humano están infiltradas por células linfoides y mieloides. El elevado número de macrófagos, células dendríticas y células T en la LP posibilitan el procesamiento y la presentación de los antígenos que cruzan el epitelio a los T CD4+ allí presentes. Las células plasmáticas (las IgA+ más abundantes que las IgM+ e IgG+) constituyen un 30-40% de las células mononucleares de la LP humana y los LB vírgenes un 15-45%.

Los LPLs, de particular importancia para la regulación de la respuesta inmunológica

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

local, son principalmente CD4+ (60-70%) y la gran mayoría expresa TcRαβ (95%). Cerca de un 10% de ellas expresa CD25+ y la mayoría CD45RO (Halstensen TS y col., 1990), lo que indica un fenotipo de memoria. Generalmente son insensibles a señales de proliferación mediadas por el TCR pero, en humanos, se puede inducir su proliferación a través de CD2. Estas células producen naturalmente gran cantidad de citoquinas con funciones homeostáticas, particularmente IFN-γ, pero también IL-4 e IL-10. Algunos LPLs CD45RO+ colaboran con los LB locales para producir IgA. Finalmente los LPLs como células reguladoras son responsables del mantenimiento de la tolerancia local a los antígenos ambientales (MacDonald y Spencer, 1994).

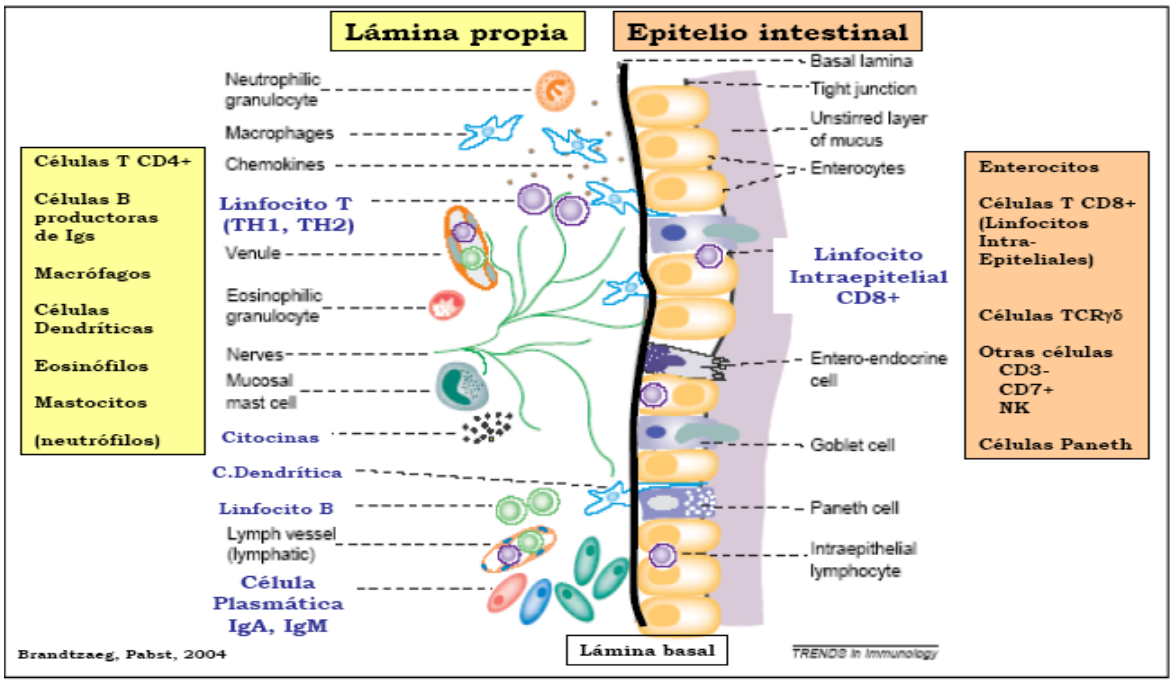


Figura 5: Poblaciones linfocitarias presentes en la mucosa del ID.

Se indican los distintos tipos celulares (enterocitos, células dendríticas, etc). Esquema adaptado de Brandtzaeg

P y Pabst R, 2004.

La inducción de la respuesta inmune requiere que los antígenos presentes en la luz intestinal puedan ser reconocidos por LT y LB, y esto se realiza mediante diferentes mecanismos activos a través de los cuales los antígenos son capturados en la luz y transportados al área subepitelial por medio de las células M, células dendríticas y células epiteliales. Los mecanismos transcelulares mediados por receptor son predominantemente degradativos y transportan macromoléculas en compartimentos endosomales.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Existen bajos niveles de antígenos HLA II en la superficie de las células epiteliales normales, que aumentan en condiciones patológicas como en EC. Estas observaciones sugieren que el epitelio intestinal puede funcionar en la captura de antígenos y o en la regulación de la respuesta de las células TCD4 en la mucosa. En una mucosa que presenta alteraciones de las vellosidades suele existir además un incremento de las células de la LP, a expensas predominantemente de linfocitos y células plasmáticas. Puede observarse también un aumento de eosinófilos y neutrófilos como parte del infiltrado inflamatorio (Trier JS, 1998; Oberhuber G y col., 1999). Los pacientes con EC e inmunodeficiencia de IgA muestran un incremento menor de las células inflamatorias en la LP. Aunque el estudio a nivel de la LP es útil, vale aclarar que ninguno de estos hallazgos es específico de la EC.

3- RESPUESTA INMUNE FRENTE A ANTÍGENOS DIETARIOS

El sistema inmune está expuesto a múltiples patógenos tales como, virus, bacterias y parásitos, frente a los que usa distintas estrategias de defensa. Además, sobre todo a través del tracto gastrointestinal, está en contacto con abundantes cantidades de antígenos alimentarios, a quienes tiene que "tolerar" como nutrientes y frente a los que no debe desarrollar respuesta alguna.

3.1 Mecanismos de Tolerancia Oral

La tolerancia es un proceso activo que lleva a un linfocito a no reaccionar frente a un antígeno. En condiciones normales, la respuesta frente a las proteínas de la dieta es denominada tolerancia oral, que se define como la falta de respuesta inmune frente a determinados antígenos ingeridos, tras su administración por vía sistémica (Chehade M y Mayer L, 2005). El mecanismo exacto de la tolerancia oral no es bien conocido, pero existen dos caminos diferentes dependientes de la dosis del antígeno. A dosis bajas, se generarían LT productores de cantidades importantes de INF-γ, TGF-β y anticuerpos anti INF-γ o IL-12 en las PP (Strober y col., 2004). A dosis elevadas se induce sólo la persistencia de los LT productores de TGF-β 1 denominados Th3 y responsables de la tolerancia oral. TGF-β 1 es capaz de disminuir las citoquinas inflamatorias y promover la producción de IgA.Un defecto de regulación llevaría a la inducción de células Th2 responsable de la alergia a alimentos, mientras que la inducción de Th1, en el otro extremo podría inducir un estado de hipersensibilidad, como es ocurre en la EC.

3.2 Síntesis de inmunoglobulina A

La respuesta humoral que predomina en la mucosa se caracteriza por la alta

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

producción de inmunoglobulina A (IgA). Los LB productores de IgA se activan principalmente en las PP. Desde las PP, los LB se dirigen a los NLM, donde terminan de proliferar y de diferenciarse en células plasmáticas (LB efectores). Luego se distribuyen a lo largo de la LP.

En la mucosa celíaca no tratada, el número de células plasmáticas secretoras de IgA está significativamente incrementada, con una alta expresión de cadenas J (Lundin KE y col., 1993). Esta observación se correlaciona con el incremento en la generación de IgA observada en cultivo de mucosa celíaca no tratada (O'Mahony S y col., 1990).

La carencia selectiva de IgA es una de las inmunodeficiencias humorales más comunes en humanos. La producción de autoanticuerpos contra la tTG de isotipo IgG e IgA es característica de la EC y es un indicio para que la enfermedad se considere de tipo autoinmune. Es de gran interés este patrón peculiar de inmunidad secretora intestinal en pacientes celíacos que persiste después que la mucosa se recobra luego de la DLG (Fais S y col., 1992).

3.3 Reactividad frente al gluten

Dado que el gluten (gliadina) es el factor inductor de la EC y que existe una asociación entre la EC y alelos HLADQ2, era previsible encontrar LT capaces de reconocer péptidos derivados de gliadina en el contexto de esas moléculas de HLA. Estas células específicas se identificaron en CMSP (Gjertsen HA y col., 1994) y también en la mucosa duodenal (Lundin KE y col., 1993).

3.4 Gliadina: Pépidos tóxicos y péptidos inmunogénicos

El gluten es una mezcla heterogénea de proteínas, cuyas dos familias principales, las gliadinas y las gluteninas, contienen péptidos deletéreos para los enfermos celíacos. Estas proteínas reciben el nombre genérico de prolaminas, debido a que comparten una secuencia de aminoácidos similar y un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos glutamina y prolina (Sturgess RP y col., 1991; Shewry PR y col., 2003). Las gliadinas son las que más se han estudiado y contienen dos tipos de péptidos. Los denominados tóxicos que inducen daño intestinal al ser añadidos en cultivo de biopsias de duodeno (Howdle PD y col., 1981) o tras su administración in vivo sobre el intestino proximal o distal (Elis y Ciclitita, 2001) y los péptidos inmunogéneticos (epítopos) que estimulan líneas células T obtenidas del intestino o de sangre periférica de pacientes con EC, con restricción HLA-DQ2 o DQ8 (Anderson y col. , 2000; Mazzarella y col. , 2003).

Los péptidos tóxicos o innatos incluyen los fragmentos p31-49 ó 31-43 de la α-

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

gliadina, producen un efecto temprano sobre el epitelio y no son reconocidos por los LT (Maiuri L y col., 2005; Maiuri L y col., 2010; Zimmer KP y col., 2010).

Algunos péptidos inmunogénicos son inmunodominantes, como los de la región 57-75 de la α- gliadina, e inducen respuestas inmunes específicas en casi todos los pacientes (Anderson RP y col., 2000; Vader W y col., 2002; Arentz-Hansen H y col., 2002). La inmunogenicidad de los péptidos depende de la riqueza de glutamina y prolina, así como de su localización en la estructura primaria, que determina la conformación molecular y sirve como residuo de anclaje a la molécula HLA-DQ. Fundamentalmente, estos aminoácidos dirigen la especificidad de la tTG. Los principales epítopes han sido identificados en las α y γ gliadinas, pero también en las gluteninas, una gran parte se une a la molécula HLA-DQ2 y otros a DQ8. La deaminación por la tTG aumenta la afinidad por las moléculas HLA- DQ2/DQ8.

3.5 Transglutaminasa tisular: Implicancias en la EC

La tTG es una enzima de amplia distribución en el organismo, cuya principal función es catalizar modificaciones de proteínas mediante reacciones de transaminación o deaminación. Además de su función como principal autoantígeno, participa del mecanismo patogénico de la EC mediante la modificación de los péptidos inmunodominantes de gliadina que aumenta su afinidad por la molécula. HLA-DQ (Arentz-Hansen y col., 2000). Recientemente se demostró que además de participar en la respuesta adaptativa, esta enzima tiene un papel activo durante la respuesta innata a gliadina (Maiuri L y col., 2010).

3.6 Perdida de la tolerancia oral al gluten en la EC

Varios mecanismos podrían ser responsables de la pérdida de tolerancia oral frente al gluten, entre ellos, la mencionada modificación enzimática de los péptidos de gliadina inducida por la tTG, que daría lugar a nuevos complejos proteicos, o las infecciones gastrointestinales virales. Estas situaciones inducen las vías pro-inflamatorias Th1 y Th17 (Monteleone I y col., 2010) y la generación de células dendríticas que activan LT reactivos al gluten. La homeostasis local puede ser alterada también por alteraciones locales que afectan al balance de citoquinas (INF-γ / TGF-β), debidas a la acción de la tTG o la IL-15, que pueden reducir o bloquear la síntesis de TGF-β (León AJ y col., 2006, Bernahmed M y col., 2007).

4- MECANISMOS INMUNOLÓGICOS DE LA EC

En la actualidad la teoría inmunológica es la que mejor explica la patogenia de la EC.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

La misma comienza tras la ingestión de alimentos que contienen gliadina. Esta proteína desencadena efectos mediados, por un lado, por la inmunidad innata a través de su acción tóxica directa sobre el epitelio; y por el otro, por la inmunidad adaptativa, a traves de los LT CD4+ de la LP o del tejido subyacente (Jabri B y Sollid LD, 2006; Jabri B y col., 2005; Koning F, 2005).

Este modelo inmunopatogénico integra una serie de procesos que se llevan a cabo en la mucosa del ID, figura 6.

4.1 Respuesta inmune innata

El principal mediador de la respuesta innata frente al gluten es la IL-15 expresada tanto por los enterocitos del epitelio superficial como por las células mononucleares de la LP (Maiuri L y col., 2003; Di Sabatino A y col., 2006). La IL-15 favorecería la activación y proliferación de los LIEs (Ebert EC, 1998), independientemente de la interacción vía TCR, además de controlar la expansión clonal de LIEs TCRγδ y de células con receptores NKG2D (Meresse y col., 2004; Hüe S y col., 2004), cuyos ligandos son las moléculas MICA (MHC de clase I- no clásica) expresadas por los enterocitos (Meresse y col., 2004; Jabri B, Sollid LM, 2006).

El resultado es la activación de fenómenos de citotoxicidad en el epitelio que, junto al debilitamiento de las uniones estrechas entre enterocitos, contribuye al aumento de la permeabilidad intestinal y al paso del gluten hasta la LP, donde se desencadenará la respuesta adaptativa. La IL-15 podría actuar como mediador de la respuesta innata y la lesión epitelial, además de promover la supervivenvia de los LT específicos y el mantenimiento de la respuesta inflamatoria (Fehniger TA y Caligiuri MA, 2001).

4.2 Respuesta inmune adaptativa

La inmunidad adaptativa está mediada por LT específicos que requieren la presentación antigénica. Las moléculas HLA-DQ2/DQ8 confieren susceptibilidad mediante la presentación de pequeños péptidos de gluten a los LTCD4+ del intestino aunque también podrían modular el desarrollo del repertorio de los linfocitos T en el timo (Faria AM y Weiner HL, 2006). Tras su estimulación, los LT dan lugar a una respuesta dominada por citoquinas de perfil Th1, con predominio de INF-γ, así como citoquinas pro-inflamatorias (TNF-α, IL-18), en ausencia de IL-12, junto con un descenso proporcional de citoquinas reguladoras o anti-inflamatorias (IL-10, TGF-β). Este patrón desaparece en los pacientes en remisión (Nilsen y col., 1998; Forsberg G y col., 2002; León y col., 2006).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

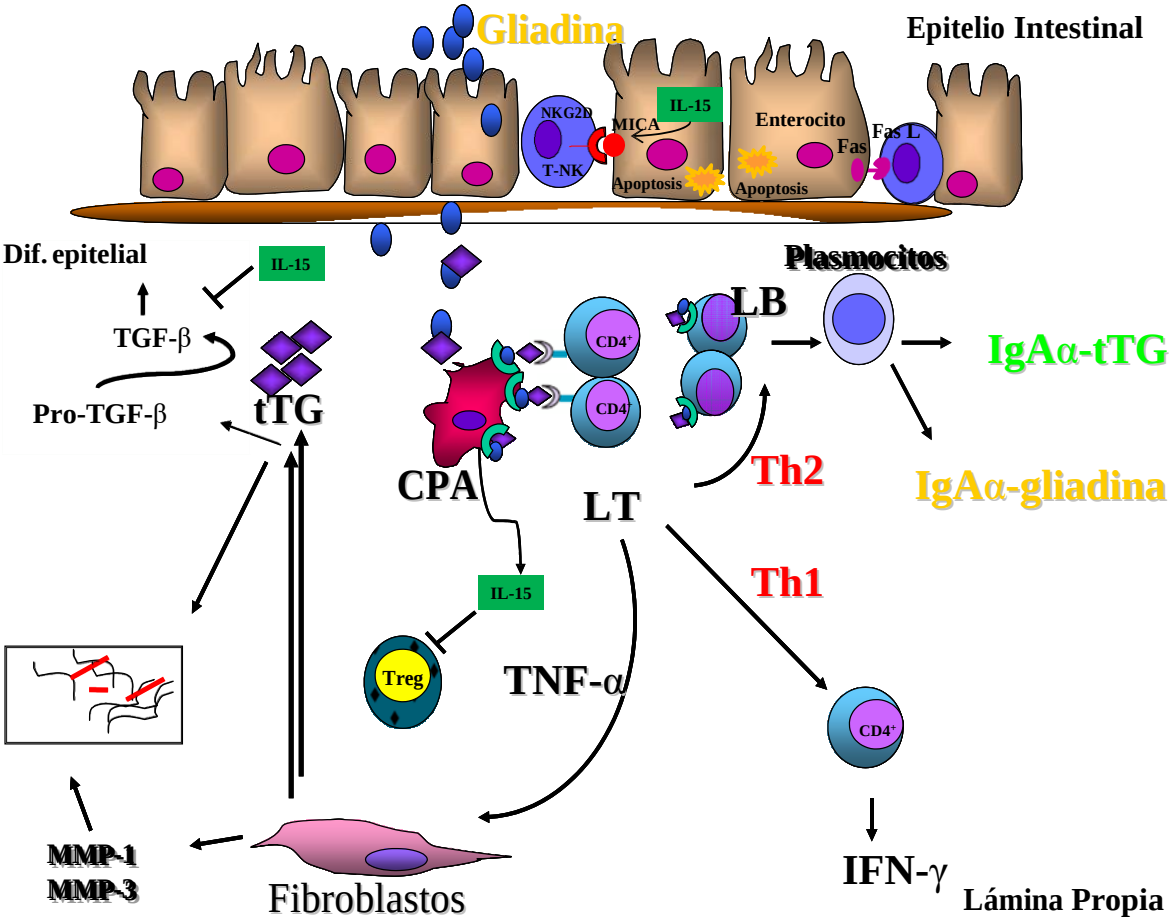


Figura 6: Modelo Inmunopatogenico de la EC.

El aumento de la permeabilidad facilita el ingreso de gliadina a la LP. Una vez allí las CPA son las encargadas de realizar la presentación antigénica a los LTCD4^{+}. Estos reconocen péptidos de gluten que fueron modificados por la tTG en el contexto de moléculas HLA-DQ2 o DQ8. La activación de los LT CD4^{+} específicos desencadena una respuesta Th1, en la que predomina el INF-γ y otros mediadores locales tales como TNF-α, entre otros. El TNF-α induce, por un lado al aumento de la síntesis de tTG e interviene en la liberación de exacerbada de metaloproteasas (MMPs) por parte de los fibroblastos. Estas MMPs son responsables de la degradación de la matrix extracelular. Los anticuerpos anti-tTG pueden bloquear la activación de TGF-β impidiendo la maduración de las células epiteliales.

Por otro lado, IL-15 producida por los enterocitos, induce apoptosis de los mismos mediante la activación del sistema Fas- FasL, como así también induce la expresión de MICA sobre los enterocitors y NKG2D en LIEs, lo que conduce a fenómenos de citotoxicidad sobre los enterocitos. IL-15 también ejerce un efecto inhibitorio sobre las células regulatorias. La producción de citoquinas Th2, conduce a la activación y expansión clonal de las células B, la cual se diferencia a célula plasmática y lleva a la producción de anticuerpos anti-AGA y anti- tTG.

4.3 Características y funciones de IL-15 y su receptor

La IL-15 es una proteína de 114 aa, con un peso molecular aparente de 14 a 15 kDa, glicosilada en dos sitios en la región C-terminal: N79 y N112. Pertenece a la familia de citoquinas tipo I, que presenta una estructura común de 4 alfa hélices antiparalelas (Bazan JF, 1990) que también comprende a IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL- 13 e IL-21. La IL-15 ejerce su efecto de forma autócrina o parácrina, mediado por receptor trimérico compuesto por una subunidad α, una subunidad β (compartida con la IL-2), y la subunidad γ común a varias citoquinas de la familia que actúa como receptor específico de gran afinidad. El complejo IL-15 con su receptor (IL-15/IL-15Rα) puede actuar en orientación cis o trans. IL-15 asociada a IL-15Rα en la superficie de una célula puede estimular en trans a células vecinas que sólo expresan IL-15Rβγ, y permitir la acción de IL-15 (Dubois S y col., 2002). La IL-15 es producida por monocitos, macrófagos y LT (Miranda-Carús ME y col., 2005; Azimi N y col., 1998). Su función principal es favorecer la proliferación y activación de células asesinas naturales (NK) (Mrózek E y col., 1996) y LT, especialmente LT CD8+ de

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

memoria (Kanegane H y Tosato G, 1996). La expresión descontrolada de IL-15 se relacionó con enfermedades autoinmunes e inflamatorias como artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, sarcoidosis y hepatitis C.

4.4 El papel de IL-15 en la EC

La IL-15 es uno de los mediadores responsables de que la activación en la LP de la mucosa repercuta sobre el epitelio. Ésto lo demuestra el hecho de que los cambios epiteliales producidos en las biopsias de pacientes celíacos estimuladas con péptidos de gliadina puedan ser bloqueados con anticuerpos neutralizantes anti-IL-15, y que la estimulación con IL-15 sólo tenga efecto sobre las biopsias de estos pacientes y no sobre el tejido normal (Maiuri L y col., 2000). Entre dichos efectos, la IL-15 promueve la proliferación y funciones efectoras de los LIEs, la secreción de INF-γ y la actividad citotóxica sobre enterocitos en pacientes con EC y ECR (Di Sabatino A y col., 2006; Mention J y col., 2003). La neutralización de IL-15 en cultivo de biopsias duodenales de pacientes celíacos inhibe la producción de INF-γ y la apoptosis de las células epiteliales demostrando su importante contribución en la injuria de la mucosa (Benahmed M y col., 2007; Maiuri L y col., 2000). El papel inmunopatogénico central de IL-15 cobra importancia también en el curso de la respuesta adaptativa. In vitro y bajo la influencia de IL-15, los monocitos se diferencian en un tipo celular que adquiere características de células dendríticas. Estas células promueven la diferenciación Th1 y Th17 en respuesta a gliadina. Dado que la gliadina promueve la síntesis de IL-15 en la mucosa duodenal, IL-15 podría favorecer la diferenciación de células dendríticas una vez que los monocitos periféricos son reclutados dentro de la mucosa intestinal (Harris KH y col., 2010). Cabe volver a mencionar que IL-15 es capaz de contrarrestar señales anti-inflamatorias mediadas por TGF-β en LPLs, una función regulatoria probablemente implicada en el mantenimiento de la condición inflamatoria crónica.

4.5 Otras citoquinas involucradas en la EC

Los efectos de diversas citoquinas y de su concentración local (Mac Donald TT y col., 1999).explican gran parte de las alteraciones características de la mucosa intestinal tales como, el aumento en la proliferación de las criptas y la apoptosis de los enterocitos. La estimulación in vitro de biopsias de ID de pacientes celíacos con péptidos de gliadina induce una respuesta de tipo Th1, en la que predomina el IFNγ, cuyos niveles se

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

normalizan en la fase de remisión del daño tisular (Nilsen EM y col., 1998). La síntesis de IFNγ dependería de factores como IFNα (Monteleone G, y col., 2001) y otras citoquinas de la familia del receptor de IL-2R tales como IL-18, IL-7, IL-15 (Salvati VM y col., 2002; Maiuri y col., 2000) e IL-21 (Fina D y col., 2008).

La IL-10 cumple un importante papel como regulador de la respuesta inmune en la mucosa y, en particular, se ha sugerido que podría inhibir las respuestas Th1 frente al gluten (Salvati VM y col., 2005). La mucosa intestinal produce IL-10, cuyo origen serían los LT de la LP (Beckett CG y col., 1996) o los LIEs (Forsberg y col., 2002), aunque existen estudios que paradójicamente no han detectado transcriptos de IL-10 en el intestino de pacientes con EC (Nilsen EM y col., 1998).En la mucosa intestinal de pacientes con EC activa también se ha observado el aumento de transcriptos de IL-27 e IL-21 (Garrote JA y col., 2008).

5- ENFERMEDAD CELIACA REFRACTARIA (ECR)

5.1 Definición, Clasificación y Tratamiento

Aproximadamente el 5% de los pacientes celíacos presenta persistencia de los síntomas asociados a la EC clásica, con atrofia de las vellosidades a pesar del consumo de una dieta estricta sin gluten (Trier JS 1991). Los síntomas más comunes en estos pacientes que desarrollan enfermedad celíaca refractaria (ECR) son diarrea, pérdida de peso, recurrencia de malabsorción, dolor abdominal, sangrado, anemia y yeyunitis ulcerosa (YU). Este síndrome también es conocido como sprue refractario y originalmente concebido para clasificar aquellos pacientes con diarrea y atrofia vellositaria que no mejoraban con la DLG (Trier JS y col., 1978). De acuerdo con lo establecido por el grupo de trabajo de Enfermedad Celíaca Europea, la ECR se clasifica en:

ECR Tipo I (ECR I): con presencia de LIEs normales.

ECR Tipo II (ECR II): expansión clonal de más de un 20% de LIEs con inmunofenotipo aberrante (Cellier CC y col., 1998; Patey-Mariaud DE y col., 2000) (Tabla 3).

Los LIEs normales de la mucosa intestinal en pacientes con EC activa expresan CD3, CD8 y los receptores de células T αβ o γδ (TCRs) en superficie; mientras que los LIEs aberrantes continúan expresando CD3 en el citoplasma pero carecen de CD8, CD3, TCRαβ y TCRγδ en superficie (Cellier C y col., 1998; Bagdi E y col., 1999; Carbonnel F y col., 1998). La pérdida de expresión de estas moléculas en superficie fue asociada a fallas en la síntesis de las cadenas polipeptídicas del receptor antigénico de CD3 (Tjon JM y col.,

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

2008). Cellier y col., 1998, fueron los primeros en demostrar que la ECR está asociada con la presencia de una subpoblación de LIEs aberrantes. El análisis inmunohistoquímico en piezas de biopsia duodenal permite diferenciar la ECR II en base al fenotipo aberrante (LIEs CD3superficial+ CD8-), respecto del fenotipo normal (LIEs CD3superficial +CD8+) (Patey-Mariaud De Serre y col., 2000).

	ECR I	ECR II
Presencia de LIEs aberrantes	< 20%	> 20%
Serología compatible con EC	No	No
Atrofia vellositaria	Sí	Sí
Monoclonalidad	generalmente	generalmente
Desarrollo de EATL en los primeros 5 años de evolución	No	Sí, 50-60%
Sobrevida > 5 años	> 95%	40-60%

Tabla 3: Características distintivas de la ECR Tipo I y ECR Tipo II. (Tomado devan de Water Jolanda M.W., y col., 2010).

Teniendo en cuenta el hecho de que los pacientes que presentan ECR II padecen un riesgo elevado de desarrollo de EATL, la precisa discriminación entre ambos tipos de la ECR es de suma importancia para establecer los criterios de diagnóstico (Al toma y col., 2007).Como se mencionó anteriormente, la expansión de los LIEs puede estar provocada por la sobreexpresión de IL-15 en el epitelio (Di Sabatino A y col., 2006; Mention JJ y col., 2003).

La identificación de una población clonal de fenotipo aberrante tiene valor pronóstico, dado que se asocia con un riesgo elevado de YU y EATL (Daum S y col 2001; Al-Toma A y col., 2007). La YU a menudo presente en el curso de la ECR, puede indicar la fase inicial de un EATL. (Bagdi E y col., 1999; Carbonnel F y col., 1998; Ashton-Key y col., 1997). El riesgo de padecer EATL es tan elevado que la ECR II es considerada un linfoma críptico de células T (Verkarre V y col., 2003).

El tratamiento de la ECR incluye el suplemento de vitaminas y minerales junto con una DLG. En algunas series de pacientes los corticosteroides (Cellier y col., 2000) e inmunosupresores indujeron mejoría clínica, (Mauriño E y col., 2002; Wahab PJ y col., 2000); sin embargo pueden promover el desarrollo no deseado de EATL (Goerres MS y col., 2003). Se han obtenido buenos resultados con el uso de infliximab el anticuerpo monoclonal anti-CD52 y la 2-clorodesoxiadenosina (Gillett y col., 2002). Sin embargo éstos fármacos no impiden la persistencia de clones de LIEs aberrantes ni la progresión a

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

linfoma, por lo que no curan la enfermedad. El trasplante autólogo de células madre hematopoyéticas también ha dado buenos resultados (Vivas y col., 2006; Al toma y col., 2006). Nuevas estrategias terapéuticas como el bloqueo de la IL-15 deben ser más extensamente investigadas.

5.2 La cadena γ del receptor antigénico de los LT (TCR-γ) y su relación con el inmunofenotipo

Los LT sufren rearreglos tempranos durante su ontogenia, tanto en las cadenas α/β como en las γ/δ de su receptor (TCR) que les confieren variabilidad y especificidad de reconocimiento antigénico. A pesar de que no se conocen completamente los factores que regulan este proceso, se cree que un rearreglo no productivo de las cadenas γ y δ promueven el posterior reordenamiento de la cadena α. Dado que la cadena β se rearregla tempranamente, si α y β son funcionales, el LT se diferencia en αβ+ y en un 80% de las células se conservan las cadenas γ y δ previamente reordenadas pero fuera del marco de lectura (Allison JP y Lanier LL, 1987). En este estudio se evalúa la cadena γ del TCR que, en base a lo expuesto, pueden ser detectadas aún cuando los clones expandidos reconocieran su origen en LIEsαβ ya que además, los genes variables de esta cadena son de bajo polimorfismo.

5.3 Linfoma T Asociado a Enteropatía (EATL): Definición y Clasificación

Un alto grado de linfomas asociados con la EC son derivados de células T (Isaacson PG y col., 1985) y han sido designados EATL. Este término fue untilizado por primera vez por O'Farrelly y col., 1986. El EATL es un tumor intestinal de LIEs, que usualmente se presenta como un linfoma de células grandes con atrofia de las vellosidades e hiperplasia de las criptas del ID (Catassi C y col., 2005). A pesar de su denominación, una gran parte de los pacientes no tiene historia previa de enteropatía clínica. Son tumores escasos, propios del adulto y de naturaleza agresiva. Aparecen como un tumor ulcerado de yeyuno o íleon, con áreas vecinas de atrofia vellositaria (Amer MH y el-Akkad SM, 1994). La clasificación de tumores EATL de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (World Health Organization WHO) describe dos tipos de EATL (Tipo I y Tipo II) en base a la forma de presentación, al inmunofenotipo de LIEs, al perfil genético, entre otros (Issacson y col., 2008), tabla 4.

EATL tipo I: es el tipo más común, se asocia con EC iniciada en el adulto.

EATL tipo II: puede ocurrir en forma esporádica.

	EATL Tipo I	EATL Tipo II

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Frecuencia	80-90% de los EATL	10-20% de los EATL
Presentación	Malabsorción, pérdida de peso	Obstrucción del intestino delgado/perforación
Inmunofenotipo de los LIEs	$CD3^+$; CD8-/+ ; CD30 +/- , CD 56^-	$CD3^+$; $CD8^+$; $CD30^-$,$CD56^+$
HLA DQ2/8	98%	30-40%
Tratamiento	CHOP + TSC alogénico	CHOP + TSC alogénico
Sobrevida > 2 años	10-15%	20%

Tabla 4: Características distintivas de EATL tipo I y EATL tipo II. (Tomado de van de Water Jolanda MW y col., 2010). EATL: Enteropatía asociada a linfoma de células T; CHOP: Ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona. TSC: Transplante de stem cells.

5.4 ECR: como puente entre la EC clásica y EATL

La EC generalemente suele ser la manifestación inicial durante para el desarrollo de EATL. Se ha descripto que aquellos pacientes que presentan ECR II, poseen un mayor riesgo de desarrollar procesos malignos, en particular asociados a EATL (Celier C y col., 2000; Gale J y col., 2000; Meijer JW y col., 2004; Howdle PD y col., 2003). Se cree que los EATL surgen en el compartimiento epitelial a partir de LIEs (Isaacson PG y col., 2001; Bagdi E y col., 1999), y como consecuencia de una severa alteración homeostática (Koning F y col., 2005). La YU, a menudo presente en el curso de la ECR, pueden indicar la fase inicial de un EATL. (Bagdi E y col., 1999; Carbonnel F y col., 1998; Ashton-Key y col., 1997).

Alrededor de un 50-60% de los pacientes con enfermedad celíaca refractaria (ECR) de tipo II puede desarrollar EATL en un plazo de 5 años (Al toma A y col., 2007; Di Sabatino A y col., 2009; Daum A y col., 2003). Si bien es una complicación rara, el EATL constituye una de las principales causas de muerte en pacientes adultos con EC sintomática.

6- DESCRIPCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LAS SÚPERFAMILIAS DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF) Y SUS RECEPTORES (TNF-R)

6.1 Súperfamilia del TNF

La súperfamilia del TNF está formada por no menos de 19 genes que codifican proteínas de membrana de tipo II. La región extracelular carboxiterminal de la mayoría de estos ligandos se procesan proteolíticamente dando lugar a proteínas solubles que es liberada al espacio extracelular.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Los ligandos de la superfamilia del TNF ejercen su acción principalmente, aunque no exclusivamente, dentro del sistema inmune y modulan tanto la inmunidad innata como la adaptativa (Locksley y col., 2001). Cada miembro de esta súperfamilia une al menos a un receptor miembro de la súperfamilia de TNF-R. Las interacciones entre proteínas de la familia del TNF y sus receptores están involucradas en procesos inflamatorios (Kollias G y Kontoyiannis, 2002), en la organización linfoide (Pfeffer K, 2003), en la activación de las células presentadoras de antígenos (CPA) (Josien R, 2000; Bachmann MF y col., 1999 y Quezada SA y col., 2004) y en la diferenciación/activación de LT (Croft M, 2003).

Algunos de los ligandos, por ejemplo el TNF-α, promueven la respuesta inflamatoria a las infecciones microbianas. Otros, como el LT-β, CD40L, LIGHT, RANKL and BAFF, regulan aspectos específicos de la inmunidad humoral y celular, como la formación de órganos linfoides, la activación de las células dendríticas y la estimulación o la supervivencia de las células T o las células B. Sin embargo, otros ligandos como el FASL (también llamado APO1L/CD95) y APO2L/ TRAIL, regulan la apoptosis inducida por activación de los linfocitos periféricos y median las actividades inductoras de apoptosis de las células asesinas naturales (NK) y los linfocitos citotóxicos. Varios de sus miembros desempeñan un papel importante en la diferenciación y desarrollo de tejidos y órganos que no pertenecen al sistema inmune como piel (ED1) y huesos (RANKLy TNF-α), (Mackay y Kalled SL, 2002).

6.2 Súperfamilia de TNF-R

La súperfamilia de TNF-R está formada por un amplio número de proteínas de membrana, la mayoría de tipo I. Entre los miembros de la súperfamilia del TNF-R la región aminoterminal extracelular es la más similar, llegando a tener hasta un 65% de identidad en la secuencia aminoacídica. La homología se encuentra principalmente en los dominios ricos en cisteínas (DRCs).

Estudios cristalográficos muestran que la región extracelular presenta una forma elongada con los DRCs en tándem. Cada DRC tiene una estructura en helice-α que se estabiliza mediante 1-3 puentes disulfuro entre cisteínas internas. La unidad de señalización básica de la súperfamilia de los receptores de TNF está formada por 3 receptores unidos mediante una molécula de ligando trimérico, figura 7.

La mayoría de los miembros de la súperfamilia de los receptores de TNF funcionan como transductores de señalización transmembrana que responden a la unión de ligando. Algunos de los receptores, sin embargo, como son OPG y DcR3 no señalizan. En su lugar, actúan como receptores que compiten por la interacción de ligandos similares con sus receptores de señalización. Los miembros de la súperfamilia de TNF-R que sí señalizan se pueden dividir en dos subgrupos principales en base a su región citoplasmática, según

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

posean o no un dominio de muerte (DD). El subgrupo de receptores que posee el dominio de muerte se denomina receptores de muerte (DR) (Ashkenazi, 2002).

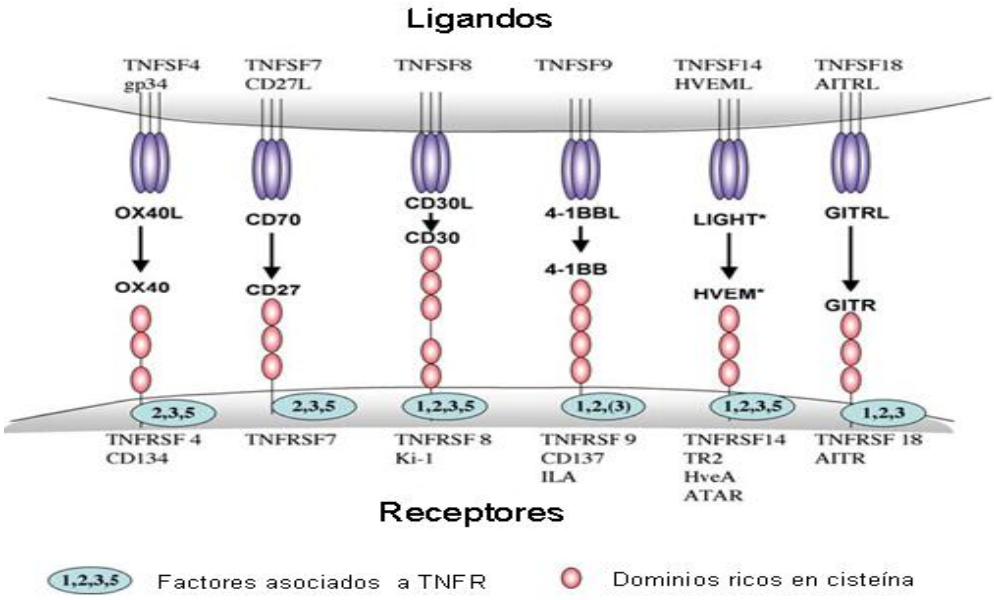


Figura 7: Súperfamilia de TNF-R y sus ligandos (familia del TNF). Adaptada de: Watts TH, 2005.

Los dominios citoplasmáticos de las moléculas coestimulatorias de la familia del TNF-R contienen motivos de unión a las proteínas TRAFs (factores asociados al receptor del TNF). Se detallan las interacciones entre las proteínas TRAF con cada familia del TNF-R.

6.3 Vías de señalización a través de la súperfamilia de TNF-R

La región citoplasmática de los miembros de la súperfamilia del TNF-R no presenta secuencias con actividad catalítica, pero se ha comprobado que para la transducción de señales son necesarias las proteínas citoplasmáticas denominadas (TRAFs). Estas proteínas forman complejos multimoleculares e interaccionan con las regiones citoplasmáticas de los receptores conduciendo a la activación del factor nuclear de transcripción kapa-beta (NF) KB que se transloca al núcleo y media la transcripción de una gran variedad de proteínas implicadas en la supervivencia, proliferación celular, la respuesta inflamatoria y inibidores de la apoptosis celular como Bcl-XL, entre otros (Karin M y Lin A, 2003).

Los miembros de la súperfamilia de TNF-R se dividen en tres grupos: los que contienen DD, receptores “decoy” (TRAIL-R3/DcR1 y TRAIL-R4/DcR2) y los factores asociados al receptor de TNF (TRAFs) (Wallach D y col., 1999). Los receptores que contienen DD, como FAS, TNFRI y DR3 pueden activar la cascada de caspasas conduciendo a la apoptosis. Los receptores que unen proteínas TRAF, como TNFRII,

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

contiene entre 4 -6 aminoácidos que permiten reclutar las proteínas TRAF (Chung JY y col., 2002).

Las proteínas TRAF están asociadas con activación celular, diferenciación y señales de supervivencia. Han sido identificadas seis tipos de proteínas TRAF (Dempsey PW y col., 2003).Todas las moléculas costimulatorias miembros de la súperfamilia del TNF-R pueden reclutar TRAF2 pero difieren en recluar otras proteínas de la familia de las TRAF (Aggarwal BB, 2003 y Arch RH y col., 1998).

TRAF2 activa también otras cascadas de transducción de señales a través de las proteínas JNK/SAPK (Dempsey PW y col., 2003; Aggarwal BB, 2003). Estas son proteínas que responden a los estímulos de estrés (citocinas, radiación ultravioleta, etc) y están implicadas en diferenciación de LT, también se ha demostrado que éstas proteínas pueden activar la vía de la MAPK quinasas y p38 (Cannons JL y col., 2000).

En resumen, las moléculas coestimulatorias miembros de la súperfamilia del TNF-R que unen proteínas TRAF activan la vía de señaliación a travéz de NF-KB promoviendo señales de supervivencia, producción de citoquinas y proliferación celular.

6.4 Moléculas coestimulatorias CD30 y OX40

CD30 y OX40 son moléculas coestimulatorias de la súperfamilia del TNF-R. Regulan la supervivencia celular y la producción de citoquinas (Del Prete G y col., 1995; Ohshima Y y col., 1998). Estas moléculas no se expresan en LT en condición basal pero se regulan positivamente frente a la activación mitogénica y su expresión es controlada por distintos mecanismos regulatorios (Toennies HM y col., 2004).

Una publicación reciente de Withers DR y col., 2009, demuestra, aunque en ratón, que señales a través de CD30 y OX40 son necesarias para la supervivencia de los LTCD4+ dentro de la LP de la mucosa intestinal y de hecho, deficiencias en CD30 u/o OX40 conducen a la reducción de las células CD4+ de la LP.

CD30: Características, funciones y vías de señalización intracelular

El antígeno CD30 fue originalmente identificado en las células de Reed Sternberg de linfoma de Hodgkin's (Schwab U y col., 1982). Se expresa en LT (αβ y γδ), LB activados, NK (Horie y Watanabe, 1998; Biswas P y col., 2000) y eosinófilos (Matsumoto K, 2004). CD30 es una proteína transmembrana glicosilada de 120/105 kDa, derivada de un precursor no glicosilado de 90 kDa (Nawrocki JF y col., 1988). La molécula CD30 humana consta de 595 aminoácidos, mientras que en ratón y rata es de 498 y 492 aminoácidos respectivamente (Bowen MA y col., 1996; Aizawa S y col., 1996). El dominio extracelular de CD30 humana consta de 362 aminoácidos organizados en seis dominios ricos

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

en cisteínas figura 8.

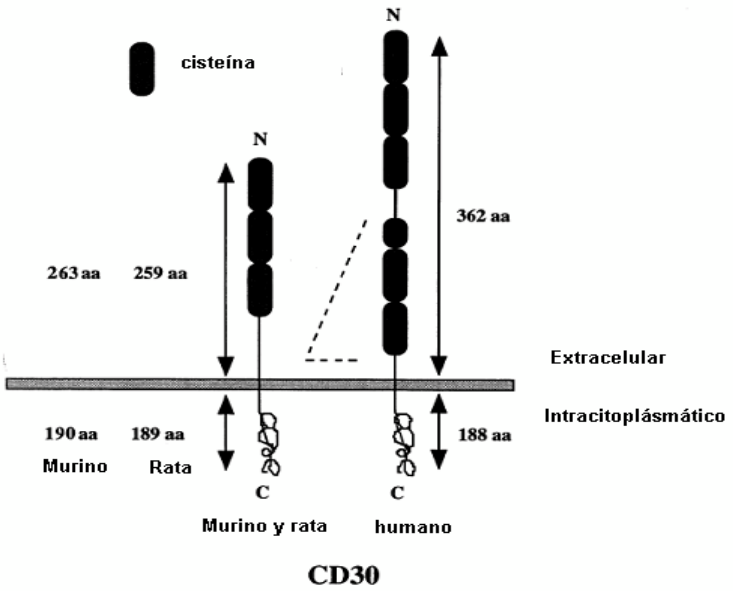


Figure 8: Organización esquemática de la molécula CD30 en humanos, murinos y rata. N: extremo NH2-terminal C: C- extremo COOH terminal.

El dominio extracelular de CD30 es clivado proteolíticamente por acción de una metaloproteasa dependiente de Zinc (Hansen HP y col., 1995), originando la forma soluble de CD30 (CD30s) de 85-90 kDa (Josimovic- Alasevic O y col., 1989). CD30 se expresa en LT activados, una característica que es compartida con otros miembros de la súperfamilia de TNF-R. Los linfocitos de sangre periférica no expresan CD30 constitutivamente sino que éste se induce a través del TCR mediante estímulos antigénicos tanto específicos como inespecíficos (Ellis TM y col., 1993, Tarkowski M y col., 2002; Horie y Watanabe, 1998; Gilfillan MC y col., 1998 y Toennies HM y col., 2004) y en respuesta a citoquinas como IL-2, IL-12, IL-4 e IL-15 (Alzona M y col 1995; Nakamura T y col., 1997 y Periolo N y col., 2010). La expresión de CD30 en LT de sangre periférica activados por PHA, conduce a la producción de IL-2, TNF e INF-γ, (Gruss HJ y Herrmann F; 1996). CD30 estimula la proliferación de LT de sangre periférica y regula la sobrevida de los mismos en presencia de la estimulación a través del TCR (Smith CA y col., 1993). En respuesta al mitógeno anti-CD3, 15 - 20% de los LT activados expresan CD30, todos éstos pertenecen exclusivamente a la población CD45RO+ (Ellis TM y col., 1993). Los primeros estudios sobre la expresión de CD30 indicaban su presencia en LT con perfil Th2 (Romagnani S y col., 1995), sin embargo, también se expresa en LT con perfil Th0 y Th1 (Tarkowsky M y col., 2003; Nakamura T y col., 1997) y de hecho los LTCD30+ producen INF-γ (Alzona M y col., 1994). Ésto indica que la expresión de CD30 está asociada con la regulación del balance fisiológico Th1/Th2 (Pellegrini P y col., 2003) Se ha descripto que la molécula CD30 interacciona sobre su C-terminal con las proteínas TRAF 1, 2, 3 y 5 (Horie R y

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Watanabe T, 1998).

La vía de señalización intracelular a traves de CD30 involucra la activación del factor de trascripción nuclear kappa (NF-kB) a travéz de la vía de las MAP kinasas (como la quinasa regulada por señales extracelulares [ERK], la Jun quinasa N-terminal [JNK] y p38) (Harlin H y col 2002; Zheng B y col., 2003), figura 9.

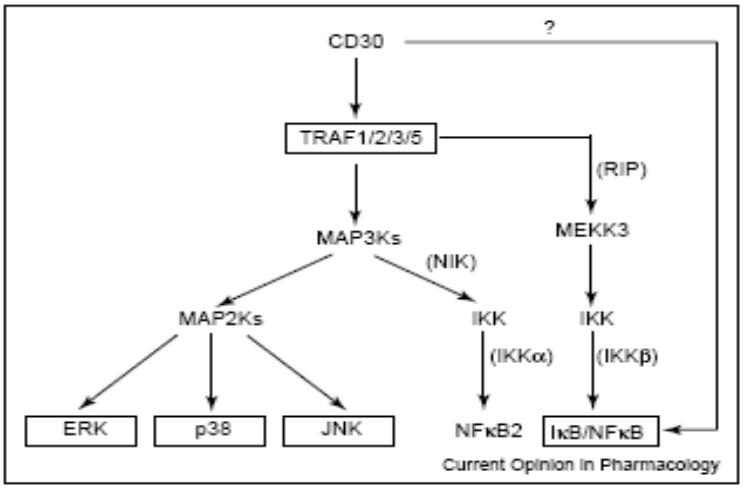


Figura 9: Vías de señalización de CD30. El esquema detalla las proteínas involucradas en mediar la señalización celular a travéz de CD30. Adaptado de Current Opinion in Pharmacology.

La proteína asociada al receptor (RIP) se une a MAP3K / MEKK3 y juntas con TRAF2 activa el complejo quinasa inhibidor (IkB). Esto conduce a la fosforilación y consigo degradacion del IkB. Una vez libre el NF-kB sé trasloca al núcleo en donde se une a la región promotora de los genes que median la síntesis de las diferentes citoquinas, entre otros factores. CD30 también puede actican a NF-kB por otros mecanismos independientes de las proteínas TRAF1/2/3/5, aún no dilucidados.

OX40: Características, funciones y vías de señalización intracelular

El antígeno OX40 fue identificado inicialmente en LT (Paterson D y col., 1987) y ha sido demostrada su función como molécula coestimulatoria (Calderhead, D. M y col., 1993 y Godfrey WR y col., 1994). Se expresa en LT CD4 y CD8 activados, pero no LT vírgenes (Mallett S y col., 1990). También se expresa en NK, LT regulatorios (Treg) (So T y col., 2008), y neutrófilos (Baumann R y col., 2004). La expresión de OX40 en LT es inducida vía TCR y el pico de expresión se observa entre las 24 y 48 h (Calderhead DM y col 1993; Gramaglia, I y col., 1998).

OX40 (CD134) es una proteína de 50 kDa (Paterson DJ, 1987), presenta un dominio N-terminal caracterizado por tres DRCs en el cual los enlaces disulfuro crean una

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

estructura terciaria que se cree que es importante para la unión del su ligando (OX40L), figura 7. OX40-L se expresa en LB activados (Stüber E, 1995), células dendríticas (Ohshima Y y col., 1997) y macrófagos (Weinberg AD y col., 1999) y también puede expresarse en LT activados. La interacción entre OX40-OX40L, es indispensable para una apropiada interacción entre células dendríticas y LT (Murata K y col. , 2000). Por otro lado, esta interacción media la adhesión entre los LT activados y las células endoteliales (Imura A y col., 1996), habiéndose demostrado además, que la misma juega un importante rol en la migración de los LT hacia los sitios inflamatorios (Nohara C y col. , 2001).

En la mucosa intestinal de ratón se ha observado que OX40 es inducible por anti- CD3 en LIEs CD8+ y se encuentra asociada con su función citotóxica (Wang HC, y Klein JR. , 2001).

Muchos estudios revelan la participación de OX40 en respuestas de tipo Th2 (Akiba H y col., 2000; Ohshima Y y col., 1998; Ishii N y col., 2003) sin embargo, es claro que OX40 también se encuentra implicada en la respuesta Th1 (Gramaglia I y col., 1998; Yoshioka T y col., 2000, Wan HC y Klein JR, 2001), en consecuencia OX40 no parece tener un papel exclusivo sobre una u otra respuesta (Arestides RS y col., 2002; Chen AI y col., 1999). La activación vía OX40 regula positivamente la expresión de moléculas anti- apoptóticas de la familia de Bcl-2 (Bcl-Xl, Bcl-2 y Bfl-1; como así también moléculas que regulan la división celular (Rogers PR y col., 2001; Song J, Salek-Ardakani S y col. , 2004; Song J y col. , 2008). OX40 utiliza los dominios ricos en cisteínas (figura 7) para unir a la molécula OX40L (Compaan DM y Hymowitz SG, 2006), de esta manera OX40 puede reclutar las proteínas TRAF 2, 3 y 5. Mientras que TRAF 2 parece jugar un papel preponderante en mediar los efectos funcionales de OX40, tales como expansión y supervivencia de LT (Prell RA y col. , 2003) , no se ha evaluado si TRAF3 y TRAF5 son requeridos para estos procesos. La señalización intracelular a través de OX40 involucra la activación de fosfoinositol 3-kinasa (PI3K)/ proteína quinasa B (PKB/Akt) y NF-kB. La figura 10 resume la cascada de señalización a través de OX40.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

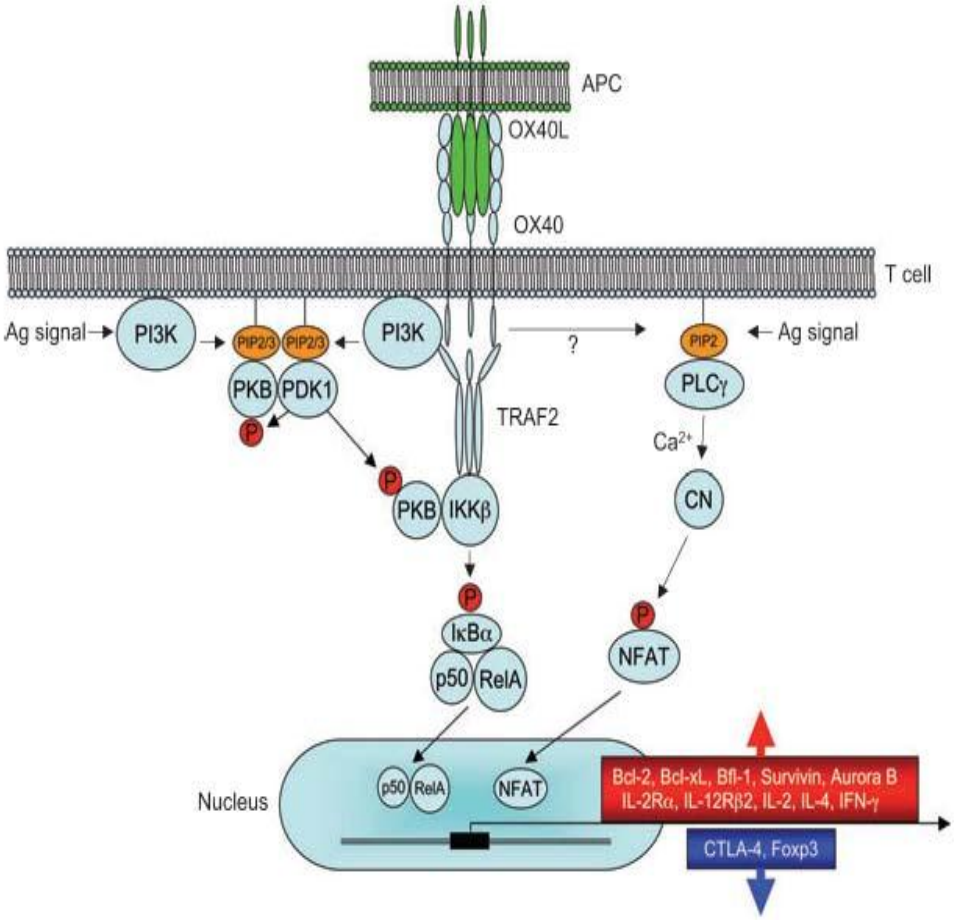


Figura 10: Vías de señalización de OX40. OX40 activa las vías de la PI3K / PKB, el N-kB1, NFAT para permitir la señalización tanto dependiente como independiente de antígeno. La unión OX40L/ OX40 recluta a TRAF 2 y desencadena señales que convergen en la activación del complejo IKK (inhibitor of NF-κB kinase), complejo que incluye a las moléculas IKKα/β, así como PI3K y PKB. Este complejo, es suficiente para activar el NF-κB de una manera Ag-independiente. La IκBα es fosforilada por IKKβ, lo que conduce a la degradación de IκBα por el proteosoma y esto permite la entrada de p50 y RelA al núcleo.Por otro lado, OX40 coopera con señales a través del TCR provocada por el reconocimiento antigénico (Ag- dependiente) para aumentar la activación de PKB, posiblemente como reflejo de un requisito para reclutar y activar la PDK1 (quinasa dependiente de fosfoinositol-1). OX40 también sinergiza a través de señales con el TCR para aumentar la concentración de Ca2+ intracelular, a través de un mecanismo desconocido, lo que conlleva a la traslocación de NFAT (factor nuclear de LT activadas) hacia el núcleo.La señalización río abajo de todas estas vías incluyen la regulación positiva de una serie de genes que controlan la división de los LT, la supervivencia, y promueve la transcripción de citoquinas, así como la expresión de receptores de citoquinas. La señalización a través de OX40 promueve la regulación negativa de CTLA-4 y Foxp3. Esquema adaptado Croft M y col., 2009).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

6.5 Implicancias de CD30 y OX40 en la EC y la ECR

Con respecto a CD30, se ha descripto un aumento de CD30 soluble (CD30s) asociado a neoplasias, infeciones virales y diversos desórdenes autoinmunes (Nadali G y col., 1995; Caligaris-Cappio F y col., 1995; Fattovich G y col., 1996; Okumura M y col., 1997;), entre los cuales se encuentra la EC. Se ha demostrado una correlacion positiva entre el aumento de CD30s y el incremento de LIEs CD3+ αβ y γδ, sugiriendo que los niveles séricos de CD30 estarían relacionados con la activación de éstas células de la mucosa intestinal (Augustin MT y col., 2005). Ha sido reportado que la expresión de CD30 en LIEs de pacientes que padecen ECR, indica un peor pronóstico para los mismos, ya que se asocia fuertemente con la posibilidad de desarrollar EATL. Por este motivo fue sugerido el análisis de CD30 dentro de los estudios predictivos para el desarrollo de EATL (Farstad IN, y col., 2002). La mayoría de los EATLs se presentan como linfomas de células grandes con fenotipo CD3+, CD8-, CD30+ ; sin embargo, también pueden encontrarse como linfomas de células pequeñas con fenotipo CD3+ CD8+ CD30- (Chott A y col., 1992; Daum S y col., 2003).

Los factores que inducen el desarrollo de linfoma en la EC son aún desconocidos. Un estudio sugiere que los individuos héterocigotas para DRB1 * 0304 son particularmente propensos a desarrollar EATL (Howell WM y col., 1995). Por otro lado, se ha sugerido también, que pacientes con EC latente y exposición contínua al gluten representan un grupo de riesgo para el desarrollo de EATL (Murray y col., 1995).

En cuanto a OX40, sólo encontramos un único reporte en literatura que demuestra la expresión de OX40 en LPLs LTCD4+ en pacientes celíacos adultos al diagnóstico (Stüber E y col., 2000), mientras que no se encuentran reportes que relacionen la expresión de OX40 con la ECR.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Hipótesis y objetivos

Los eventos desencadenados en la mucosa del ID luego de la ingestión de gliadina, en individuos genéticamente susceptibles de padecer la EC, involucran ambas ramas de la respuesta inmune: innata y adaptativa. Dichos eventos son parcialmente dependientes de la activación de los LT intraepiteliales y de los de la lámina propia. Las diferentes fases de maduración / diferenciación de los LT se encuentran finamente reguladas en todos sus estadios: desde su menor madurez como células vírgenes hasta la adquisición de sus características efectoras, la transformación en células de memoria e inclusive su posterior reactivación. Los miembros de la súperfamilia del receptor del factor de crecimiento tumoral (TNF-R) son moduladores de dichos procesos de diferenciación, y su expresión está regulada por diferentes citoquinas locales.

Con cierta frecuencia una proporción de pacientes pediátricos adquiere “tolerancia” natural a la gliadina, mientras que una proporción de pacientes adultos desarrolla complicaciones de la EC clásica y pérdida de la tolerancia a la DLG. Tal diversidad en la forma de presentación de la EC entre pacientes adultos y pediátricos nos permite inferir la existencia de probables diferencias de la respuesta inmunológica, respecto a las moléculas de activación y a las moléculas coestimulatorias, entre ambos grupos etarios.

En ECR, por otro lado, los reportes de la literatura son aún escasos y heterogéneos en relación a la definición de criterios de diagnóstico y pronóstico, así como a los mecanismos inmunopatogénicos involucrados.

Nuestra hipótesis consiste en que el análisis de moléculas coestimulatorias de la familia de TNF-R (CD30, OX40) y moléculas de activación podría develar aspectos diferenciales en cuanto a la activación y función de los LT en el compartimiento local, y/o en el compartimiento periférico (considerado como un modelo in vitro y sólo potencialmente ligado al compartimiento mucoso) entre individuos control y pacientes celíacos. Dichos aspectos podrían, además, diferir entre pacientes pediátricos y adultos en la EC clásica. Finalmente y con respecto a la ECR, los hallazgos derivados de un análisis de correlación entre parámetros celulares / moleculares, con parámetros clínicos, bioquímicos, histopatológicos o de su evolución (tiempo de evolución, causa de defunción) podrían arrojar novedosas informaciones que pudiera posteriormente ser transferida al ámbito asistencial.

Nuestro objetivo general es identificar diferencias en expresión, modulación y función de moléculas coestimulatorias de los LT en el curso de la EC clásica y la probable correlación entre los compartimientos local y periférico. Dados el diferente modo de presentación y evolución de la EC en pacientes pediátricos y adultos, nos proponemos analizar pacientes de ambos grupos etarios por medio de un análisis de casos versus controles.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Por otro lado, examinar parámetros celulares / moleculares complementarios a los habitualmente utilizados para el seguimiento de pacientes con ECR y su posible asociación con el desarrollo de EATL. Integrar y correlacionar dichos estudios con los parámetros convencionalmente descriptos en pacientes con ECR.

Para poner en práctica nuestro objetivo general, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Analizar la expresión de marcadores de activación CD25, CD69, CD45RO, CD30 y OX40 en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) en presencia o ausencia de estímulo mitogénico policlonal, y en subpoblaciones de LIEs y LPLs de biopsias duodenales en condición basal.

- Estudiar la modulación de la expresión de CD30 y OX40 por IL-15 e IL-2 en CMSP, y luego de una breve estimulación con gliadina o IL-15 en LIEs y LPLs.

- Caracterizar funcionalmente las subpoblaciones CD30+ y OX40+ a través del análisis del perfil de citoquinas Th1/Th2 en blastos T, y la posible influencia de IL-15 e IL-2 sobre las mismas.

- Analizar la expresión de citoquinas centrales de la EC clásica (IL-15, IL-18 e INF-γ) en biopsias intestinales de pacientes con ECR.

- Estudiar la naturaleza clonal del infiltrado linfocitario en biopsias intestinales de pacientes con ECR.

- Integrar y correlacionar los parámetros convencionalmente descriptos en pacientes con ECR, con estudios moleculares, celulares y desarrollo de EATL.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Materiales y métodos

1 PACIENTES

En este trabajo se incluyeron 38 pacientes adultos y 33 pacientes pediátricos con EC activa. La edad promedio para los adultos fue 47 años (76-19 años), 30 fueron de sexo femenino y 7 masculino. Para los pacientes pediátricos, la edad promedio fue 12 años (2-18 años), 20 fueron de sexo femenino y 13 masculino. Se incluyó un grupo de 37 pacientes con ECR, 23 de sexo femenino y 14 de sexo masculino, de edad promedio 47 años (25-57 en sexo femenino; 31-61 en sexo masculino). Todos los pacientes con ECR fueron tipificados como HLA-DQ2/DQ8.

Con respecto a los controles, se incluyeron 40 individuos adultos y 24 pediátricos que asistieron a los centros médicos debido a distintos síntomas abdominales, y en los cuales de descartó la presencia de EC en base a criterios serológicos e histológicos.

Las muestras provinieron del Hospital Municipal de Gastroenterología “Dr. B. Udaondo”, de la Unidad de Gastroenterología del Hospital de niños “Ricardo Gutiérrez” y del Servicio de Gastroenterología del Hospital de Niños de San Justo; las mismas fueron obtenidas al momento del diagnóstico de la EC.

La tablas A y B, C muestran las características epidemiológicas, serológicas e histológicas en pacientes celíacos adultos, pediátricos y refractarios, respectivamente.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Paciente	Sexo/Edad (años)	Clasificación histológica	Número de LIEs/ 100 enterocitos	Anti-tTg	Ema
1	F/55	III b + III c	70	+	+
2	F/44	III c	52	-	+
3	F/38	III c	70	+	+
4	F/40	III c	34	+	+
5	M/25	III c	38	ND	+
6	F/39	III c	59	+	+
7	F/31	III c	39	+	+
8	F/30	III c	45	+	+
9	F/29	III b + III c	32	+	+
10	F/45	III b + III c	30	ND	+
11	F/19	III b + III c	24	+	-
12	F/23	III c	36	+	+
13	F/35	III b	30	-	-
14	F/28	III a + III b	28	+	ND
15	F/24	III a	39	+	+
16	F/55	III a	38	+	+
17	F/60	III a	30	+	+
18	F/69	III c	45	+	-
19	F/33	III c	44	+	ND
20	F/56	III c	ND	+	-
21	F/47	III c	ND	-	+
22	F/31	III c	40	+	-
23	F/37	III a	36	+	+
24	F/45	III c	40	+	+
25	M/43	III c	27	+	+
26	F/76	III c	40	+	+
27	M/56	III c	40	+	+
28	M/59	III b + III c	41	+	ND
29	F/42	III a	35	+	-
30	M/54	III b	28	-	+
31	F/61	III c	63	+	+
32	F/67	III c	54	+	+
33	F/59	III c	52	+	+
34	M/33	III c	ND	+	+
35	F/40	III c	ND	+	+
36	F/40	III c	ND	+	+
37	F/42	III c	64	+	+
38	M/44	III c	44	+	+

Tabla A: Datos Epidemiológicos, histológicos y de laboratorio de los pacientes celíacos adultos. F= femenino, M= masculino. Clasificación histológica de Marsh (Marsh MN y Hinde J, 1986). Anti-tTG = anticuerpos IgG anti-transglutaminasa tisular. EmA = anticuerpos IgG anti-endomisio. Un porcentaje de LIEs mayor a 22% constituye un adecuado umbral para discriminar EC y controles (Cabanne, A y col. , 2007). ND= no determinado.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Paciente	Sexo/Edad (años)	Clasificación histológica	Anti-tTg	Ema
1	F/5	III c	+	ND
2	F/7	III c	ND	+
3	F/6	III c	+	+
4	F/9	III c	+	+
5	M/12	III c	+	+
6	F/3	III c	+	+
7	F/5	III c	+	+
8	F/10	III c	ND	+
9	F/3	III c	+	+
10	F/4	III c	+	+
11	F/7	III c	+	-
12	F/3	III c	ND	+
13	F/8	III c	+	-
14	F/9	III c	+	ND
15	F/12	III c	+	ND
16	F/7	III c	+	+
17	F/5	III c	ND	+
18	F/4	III c	+	+
19	F/6	III c	+	+
20	F/9	III c	ND	ND
21	F/6	III c	+	+
22	F/4	III c	+	-
23	F/7	III c	+	+
24	F/11	III c	+	ND
25	M/10	III c	+	+
26	F/8	III c	ND	+
27	M/3	III c	+	+
28	M/5	III c	+	+
29	F/4	III c	+	+
30	M/7	III c	+	+
31	F/10	III c	+	+
32	F/7	III c	+	ND
33	F/5	III c	+	+

Tabla B: Datos Epidemiológicos, histológicos y de laboratorio de los pacientes celíacos pediátricos incluidos. F= femenino, M= masculino. Clasificación histológica de Marsh (Marsh MN y Hinde J, 1986. Anti-tTG = anticuerpos IgG anti-transglutaminasa tisular. EmA = anticuerpos IgG anti-endomisio. ND= no determinado.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Paciente	Sexo/Edad (años)	Anti-gliadina (IgA)	Anti-gliadina (IgG)	Ema
1	F/29	–	+	+
2	F/50	–	+	–
3	F/46	–	+	–
4	M/31	–	+	+
5	F/58	–	–	–
6	F/38	+	+	–
7	F/53	+	+	–
8	F/54	–	–	+
9	M/45	–	–	–
10	F/63	+	+	–
11	M/50	–	–	+
12	M/39	+	+	–
13	M/53	ND	ND	ND
14	M/33	ND	ND	ND
15	F/25	ND	ND	ND
16	M/46	ND	ND	ND
17	F/43	ND	ND	ND
18	F/55	ND	ND	ND
19	F/54	–	–	–
20	M/44	+	+	–
21	F/41	+	+	+
22	M/52	+	+	+
23	F/54	+	+	–
24	M/60	+	+	+
25	F/53	+	+	–
26	F/43	+	+	+
27	F/53	–	+	+
28	M/50	+	–	+
29	M/61	–	+	+
30	F/57	+	+	–
31	F/45	+	–	–
32	F/37	ND	ND	ND
33	F/47	ND	ND	ND
34	F/51	ND	ND	ND
35	F/46	ND	ND	ND
36	M/39	ND	ND	ND
37	M/52	ND	ND	ND

Tabla C. Características epidemiológicas de los pacientes con ECR.

Anticuerpos IgA e IgG anti-gliadina respectivamente. EmA = anticuerpos IgG anti-endomisio. ND: no determinado, a: años, m: meses. M: Masculino, F: Femenino.

1. Obtención de Muestras Biológicas

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

En pacientes pediátricos, las biopsias duodenales se obtuvieron utilizando cápsula de Crosby-Kugler modelo pediátrico de doble boca. Las biopsias de los pacientes adultos se obtuvieron por medio de video- endoscopía. La sangre de todos los pacientes se extrajo luego de la recuperación del efecto provocado por la anestesia utilizada para la toma de biopsia.

Sangre

Aproximadamente 20 ml de sangre de los pacientes adultos y 10 ml de los pacientes pediátricos se fraccionaron en dos tubos según su uso (I) en heparina para el aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica (CMPS), a temperatura ambiente y (II) con EDTA (ácido etildiaminotetraacético) para estudios de HLA, conservada a -20Co.

Biopsias duodenales

Las biopsias duodenales fueron divididas y conservadas de acuerdo con su uso: (I) en solución fisiológica a 4oC hasta el aislamiento de las subpoblaciones celulares (LIEs y LPLs), (II) en solución fisiológica a -20oC, para la extracción de ADN, para los ensayos moleculares correspondientes al estudio de TCR- γ, (III) en Trizol®Reagent (GIBCO BRL) a -70oC para la obtención de ARN, al fin de determinar la expresión de transcriptos de citoquinas por RT- PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction), (IV) en formol para su posterior inclusión en parafina y obtención de cortes histológico para inmunohistoquímica.

2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR

2.1 Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

A partir de 10 ml de sangre heparinizada se aíslan CMSP mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque. La sangre diluida 1:1 con PBS (1X) (tampón fosfato salino) se añadió sobre 7 ml de Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suiza). Tras la centrifugación a 2000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente (TA), se recogió la “nube” de CMSP que contiene linfocitos y monocitos.

Se lavaron las células dos veces con PBS (1X), se centrifugaron dos ciclos de 5` cada uno a 2000 rpm y se resuspendieron en medio RPMI 1640, (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2mmol/L-glutamina (Sigma Chemical Co, Saint Louis, Mo, USA) y 50ug/ml de gentamicina.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Cultivo y estimulación mitogénica de CMSP

Las CMSP fueron cultivadas (1.106 células/ml) en microplacas de 24 pocillos (Costar, Cambridge, MA, USA), pre-activadas con anti-CD3 (1µg/ml) en RPMI-1640 (Gibco), 10% SFB y antibióticos por 2h a 37 Co en estufa gaseada (CO_2 5%). Las células permanecieron entre 3 y 5 días en cultivo a fin de realizar una cinética de expresión de diferentes moléculas de activación (CD25, CD69, etc) en blastos T. Las CMSP fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Gibco) sin estímulo mitogénico como control experimental.

Estimulación de CMSP utilizando citoquinas

Una vez obtenidos los blastos T éstos se incubaron con las citoquinas recombinantes humanas rIL-15 (50ng/ml) e rIL-2 humana 10ng/ml por 3 días en placas de 24 pocillos conteniendo medio RPMI suplementado como se mencionó previamente.

Como se indica en las respectivas secciones, las CMSP de cada paciente fueron cultivadas en diferentes condiciones (I) sin estimulación mitogénica o utilizando control de isotipo (MOPC-21, γ1, kappa, Sigma Chemical, St. Louis, Mo), (II) en presencia de anticuerpo monoclonal anti-CD3 (III) en presencia de anti-CD3 y citoquinas, iv) con citoquinas y v) con anticuerpo neutralizante anti-IL-15 (IgG1, clon 34505, R&D).

Ensayo de proliferación celular

La proliferación celular fue evaluada a través de la técnica de incorporación de timidina tritiada. Para ello, los blastos obtenidos se recogieron (aproximadamente 2.105 células/pocillo) a una concentración de 1.106 células/ml y se pulsaron con 1µCi [3H]-timidina (Amersham) en placa de 96 pocillos durante 14 h. Cumplido ese tiempo se filtraron las células en un recipiente recolector adecuado y luego se evaluó la incorporación de radioactividad al ADN utilizando un contador de centelleo líquido. Los resultados se expresaron en cuentas por minuto (cpm).

1.5 Inmunomarcación para Citometría de flujo (CF)

Se evaluó el inmunofenotipo de las CMSP y subpoblaciones de LIEs y LPLs provenientes de biopsia intestinal. .

Antígenos de superficie

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Las células frescas extraídas de sangre o tejido fueron lavadas dos veces por centrifugación a 2000 rpm durante 5´ a 4ºC con PBS 1X, 10% de SFB y 1 g/l de azida sódica (Sigma). A continuación, se incubaron 2.105 – 1.106 células con los anticuerpos monoclonales respectivos (Tabla C) durante 30´, a 4ºC y en oscuridad. Posteriormente, las células fueron lavadas nuevamente dos veces y analizadas en el citómetro de flujo (FACS Calibur, BD). Los análisis se realizaron utilizando el software WinMDI versión 2.9. En todos los casos se utilizaron anticuerpos inespecíficos del mismo isotipo e igual fluoróforo que cada anticuerpo específico como control negativo. La Tabla C muestra el listado de los anticuerpos monoclonales utilizados en los experimentos de CF.

ANTICUERPO	CONJUGADO	ISOTIPO	CLON	CASA COMERCIAL
anti-CD3	PerCP	IgG1	SK7	Becton Dickinson (BD)
anti-CD25	PE	IgG1	2A3	Dako
anti-CD45RO	PE	IgG1	UCHL1	Dako
anti-CD69	FITC	IgG1	FN50	BD
anti-CD103	FITC	IgG1	Ber-ACT8	BD
anti-CD30	FITC	IgG1	Ber-H8	BD
anti-OX40	FITC	IgG1	ACT 35	BD
anti-INF-γ	PE	IgG2A	4S.B3	R&D
anti-IL-4	PE	IgG1	8D4-8	BD
Control	PE	IgG1	X40	BD
Control	PE	IgG2A	X39	BD
Control	PerCP	IgG1	X39	BD
Control	FITC	IgG1	X39	BD

Tabla C. Anticuerpos monoclonales utilizados para CF.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína, PE: Ficoeritrina, PerCP: proteína clorofila peridinina. IgG: Inmunoglobulina G.

Antígenos intracitoplasmáticos

El porcentaje de blastos productores de INF γ o IL-4 se obtuvieron luego de implementar los pasos recomendados por el fabricante (R&D) en cultivos sometidos a estimulación mitógenica o luego de la incorporación de citoquinas (IL-15 e IL-2).

Producción de INF-γ e IL-4 mediante el ensayo de ELISA

La cuantificación de INF-γ e IL-4 en sobrenadantes de cultivo se determinó siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante (R&D). El rango de detección para INF- γ es 4,7 - 300 pg/ml, para IL-4 es 7,8 -500 pg/ml. Se realizaron diluciones seriadas y determinaciones por duplicado de cada muestra. Se midió la absorbancia (450nm) en espectrofotómetro Labsystems Multiskan (MS, Argentina).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

2.2 Estudios en biopsias duodenales

Comprenden cultivos de explantos de biopsias intestinales, extracción de las subpoblaciones linfocitarias, estudios de inmunohistoquímica, producción de citoquinas y análisis de los rearreglos de TCR-γ y niveles de transcriptos de citoquinas, estos últimos evaluados por PCR-semi cuantitativa.

2.1. Cultivo de biopsias duodenales con gliadina e IL-15

Las biopsias fueron lavadas en el buffer HBSS sin Ca++ Mg++ (solución salina equilibrada de Hanks, libre de Ca++ y Mg++) con gentamicina (50ug/ml) y cultivadas por 3 h en medio RPMI 1640 (Gibco) solo (como control intra-paciente) o con gliadina (0,1mg/ml, Sigma) en estufa gaseada (5% CO2). Una vez finalizado el cultivo, las biopsias fueron colocadas en buffer HBSS a fin de comenzar el aislamiento de LIEs y LPLs. En algunos experimentos las biopsias fueron incubadas con IL15 (50ng/ml) por 3h.

Obtención de LIES y LPLs

Luego de la estimulación, las biopsias recolectardas en tubo falcon de 15 ml se incubaron en buffer HBSS sin Ca2+y Mg2+, EDTA (1mM) y DTT (Dicloro Difenil Tricloroetano) (1mM) durante 1 h a 37 oC con agitación (200 rpm).

La suspensión de células obtenidas (LIEs y enterocitos) fue transferida a un nuevo falcon y conservada a 40C, hasta obtener la fracción celular enriquecida en LPLs. A la biopsia que permaneció en el falcon original se le agregó 25ml de RPMI conteniendo colagenasa A (10mg/ml). Se incubó por 1h30´ a 37 0C con agitación a 200 rpm. Luego se recuperó la suspensión celular conteniendo los LPLs y se guardó la biopsia remanente en trizol (para futuros ensayos moleculares). Las fracciones de LIEs y LPLs fueron centrifugadas a 1500 rpm por 5` a 4oC. El pellet obtenido fue lavado una vez en PBS 1X, 10% SFB, y finalmente resuspendido en PBS 1X. Se contaron las células y se procedió a la inmunomarcación utilizando los anticuerpos específicos y controles correspondientes. Las células marcadas fueron lavadas dos veces con PBS 1X 10 SFB y analizadas por CF.

Estudio Inmunohistoquímico

Los tejidos fueron fijados en formol neutro 10%, incluidos en parafina, y cortados en secciones finas de 3-5 micrómetros. Las secciones fueron desparafinizadas, re-hidratadas y se bloqueó la actividad peroxidasa con metanol 3% en H2O2. Se realizó un tratamiento estándar con citrato de sodio 0.1M pH=6, con el fin de facilitar la exposición

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

antigénica y seguidamente se realizó una pre-incubación con suero de caballo (Vector Laboratories, USA) por 1h. Se realizó la marcación con anti-CD30 (IgG1 clon Ber-H2, Dako) 1:10 en PBS 1X y se incubó durante 24h a 4ºC en cámara húmeda. Cumplido el tiempo se efectuaron lavados en PBS1X para quitar el exceso del anticuerpo y se añadió un complejo avidina-biotina- peroxidasa al anticuerpo secundario biotinilado (Vectastain® Universal Elite®, Vector Laboratories). Como sustrato de revelado se utilizó 3,3` diaminobenzidina (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK).

La reacción de revelado (1` aproximadamente) se detuvo por inmersión de los vidrios en agua destilada. Se incubaron las secciones en hematoxilina de Harris 10% durante 3´, se lavaron con agua corriente para obtener el viraje del colorante, y luego con agua destilada. Finalmente se deshidrataron los tejidos mediante sucesivos pasajes en mezclas de etanol/agua de concentración etanólica creciente, seguidas por dos incubaciones con xilol y se incluyeron en medio de montaje permanente (VectaMount, Vector). La observación se realizó bajo microscopio óptico. Se obtuvieron fotografías a 100x, 400x y 1000x.

3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.1 Obtención de ADN de sangre periférica

Se procedió al aislamiento de ADN a partir de sangre entera recolectada con EDTA de acuerdo el protocolo comercial establecido por QUIAGEN (Flexi Gene DNA Kit).

La tipificación HLA-DQ2/DQ8 fue realizada en el Servicio de Inmunogenética del Hospital de Clínicas “José de San Martín”.

3.2 Purificación de ARN a partir de tejidos

Se purificó ARN según las instrucciones del catálogo de Trizol®Reagent (Gibco BRL). El tejido fue disgregado por homogeneización mecánica en 1 ml de Trizol e incubados 5´ a TA. Se agregaron 200ul de cloroformo, se agitó vigorosamente el tubo por 15´´, luego se incubó 2-3´ a TA y se centrifugó a 12000g durante 15´ a 4 Co. Se recuperó el ARN de la fase acuosa luego del agregado de 500ul de isopropanol, se incubó 10´ a TA y se centrifugó a 12000g por 10´a 4 Co. El sobrenadante fue removido y el pellet fue lavado con 1ml de etanol 75%, sedimentado por centrifugación a 7500 g durante 5 min a 4Co y, secado a TA durante 10-15´ y se resuspendió en 15-20 µl de agua (libre de RNAsas) pre-tratada con pirocarbonato de dietilo (DEPC) 1/1000.

Cuantificación relativa de ARN: Se partió de biopsias de 0,5-2mg y se obtuvieron entre 5 y 10 µg ARN total/mg de tejido procesado. Esta baja recuperación no permitió cuantificar

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

dicho ARN espectrofotométricamente, por lo cual se estimaron las concentraciones de ARN mediante su visualización en geles desnaturalizantes de agarosa 1.2% preparado en buffer ácido 3-N-morfolino-propanosulfónico (MOPS 1X); 1.20µl de formaldehido 37% y bromuro de etidio 10mg/ml).

Se obtuvieron CMSP a partir de 10ml de sangre de un individuo control y se extrajo ARN (3,5 µg de ARN/106 CMSP y 37µg de ARN total) con el que construyó una curva de concentraciones decrecientes: 900, 600 y 300 ng/ µl. Seguidamente se corroboró la masa de ARN en las muestras incógnita por comparación con dicha curva en geles de agarosa 1.2%. Se estimó la concentración aproximada de las preparaciones de ARN provenientes de las biopsias intestinales por dilución de las mismas a fin de que su masa estuviera comprendida dentro de las masas de nuestra curva de ARN patrón.

3.3 Aislamiento de ADN plasmídico

Se realizó una extracción de ADN plasmídico a partir de un cultivo de bacterias E.coli transformadas con el plásmido pMBEK que fue gentilmente cedido por la Dra. V. Salvatti como stock en agar 0,8%. Se partió de varios clones aislados en placa con medio de cultivo sólido (LB-agar con ampicilina concentración como medio selectivo). Se realizó una preparación en pequeña escala mediante la lisis alcalina del cultivo y posterior precipitación del ADN plasmídico con etanol. Se resuspendió el ADN plasmídico en 90µl de buffer TE pH 8,0 (10mMTris –HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8,0). Se lo trató con RNAsa (1µl RNAsa 100x en 90 µl stock, 20 minutos a 45o C). Se corroboró su tamaño (4 Kb) e integridad por electroforesis en gel de agarosa 1% en TBE (45mM Tris, 44 mM ácido bórico, 1 mM EDTA pH 8,0). Luego se realizó la cuantificación espectrofotométrica del ADN por lectura de la densidad óptica a 260/280nm.

3.4 Retrotranscripción

La síntesis de ADN copia (cADN) total (utilizando fragmentos de oligo-dT) o específico (utilizando un primer 3'para INF-γ, IL-18 o IL-15) fue realizada como indica el catálogo de Promega: el ARN total fue calentado a 65 oC durante 4´, centrifugado e incubado a 42oC durante 1h con 625µM dNTP´s (dinucleótidos trifosfato) 15 unidades de RNAsin (Promega, Madison WI), 30-45 pmoles del primers y 0,1 unidad de transcriptasa reversa del virus de la leucemia aviar murina (MMLV, Promega) en Tris-HCl 10 mM, KCl 15 mM , MgCl2 0,6 mM, DTT 2 mM. Posteriormente se calentó la mezcla de reacción a 95oC por 10´para inactivar la enzima. Como control negativo se realizó una retrotranscripción en ausencia de ARN.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

3.5 Amplificación de citoquinas IL-15, INF-γ e IL-18 por RT-PCR semi- cuantitativa

Se diseñaron oligonucleótidos para la semi-cuantificación de transcriptos (tabla D). A continuación se determinaron las condiciones de amplificación, corroborándose los tamaños esperados para cada producto de PCR.

mRNA	Primer 5` (5` 3`)	Primer 3` (5` 3`)
β-actina	TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CTA	TAG AAG CAT TTG CGG ACG ATG GAG GG
IL-15	GCA GGG CTT CCT AAA ACA GAA GCC CAT	GCA TCC AGA TTC TGT TAC ATT CC GCT
IL-18	GTC CTG GGA CAC TTC TC	GCT GAA CCA GTA GAA GA
INF-γ	AAG ATG ACC AGA GCA TCC AA	TCC TTT TTC GCT TCC CTG TT

Tabla D: Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en el ensayo de PCR.

El control de amplificación exógeno se llevó a cabo sobre el plámido pMBEK. Se realizaron reacciones de PCR incubando los respectivos cADNs en 25 µM (micromoles) de cada uno de los primers, utilizando una mezcla de reacción conteniendo MgCl 2mM, dNTPs 250 µM, 1 U (unidades) de Taq polimerasa (Highway), KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,0 y Tritón X-100 0,1% en un volumen final de 50 µl. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador PTC-100 TMMJ Reserch (MJ Reserch Inc, Watertown, CT).

3.6 Cuantificación de β-actina

Se llevó a cabo por PCR semi-cuantitativa utilizando el plásmido pQB1/3 que contiene dos secuencias cortas del gen de la β-actina, y un par de primers que reconocen dichas secuencias en el plásmido y en los transcriptos endógenos. En el caso del plámido, el producto de PCR para β-actina es un amplicón de 238pb. Se determinó la concentración del plásmido (5x104 pg/µl) y se ensayaron diferentes diluciones de pQB1/3 hasta construir una curva con diluciones comprendidas entre 2 hasta 0,0625pg/µl. Con 1µl del cADN producto de la misma RT utilizada previamente para analizar IL-15, IL-18 e INF-γ en las diferentes muestras y 5µl de cada dilución de la curva, se llevaron a cabo las reacciones de PCR para β-actina. Se utilizó el siguiente programa de amplificación: desnaturalización 1´ a 94 oC, annealing 1´ a 55 oC, extensión 1´a 72 oC, repetición del ciclo anterior 29 veces y luego una extensión final de 2.5´ a 72 oC.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa 1,5%

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

en TBE y visualizados por tinción con bromuro de etidio. Se obtuvieron bandas de β-actina endógena (218pb) de intensidades variables entre las diferentes muestras. Las bandas de las muestras y de la curva se cuantificaron por densitometría óptica. Luego se graficó una curva de β-actina utilizando los valores de densidad óptica en función de los pg/µl de las diluciones respectivas. Se realizó la cuantificación de β-actina en las diferentes muestras por interpolación y se expresaron las concentraciones en pg β-actina/ µl cADN. Con aquellas muestras cuya banda de β-actina no entró en curva, se procedió a repetir el procedimiento modificando el volumen de cADN utilizado en la reacción de PCR hasta obtener valores de DO adecuados.

3.7 Normalización de resultados

Por un lado, se cuantificó el número de transcriptos de IL-15, IL-18 e INF-γ presente en un volumen dado de cADN para cada muestra. Por otro lado, los pg β-actina/µl del mismo cADN. Con estos valores, se procedió a calcular los pg de β-actina presentes en el volumen de cADN utilizado para amplificar las citoquinas correspondientes. Finalmente, se expresó el número de transcriptos como el número de moléculas de transcriptos de citoquinas/pg de β- actina.

3.8 Obtención de ADN para estudios de clonalidad en biopsias

Las secciones de tejido intestinal fresco provenientes de pacientes refractarios fueron homogeneizadas en 500 µl de buffer WCLB (10 mM Tris pH 7,6; 10 mM EDTA pH 8; 50mM NaCl; 0,2 % SDS) y 15 µl de Proteinasa K. Se incubó ON (over night) a 42ºC con agitación y luego se realizó una extracción utilizando como solventes orgánicos fenol saturado en agua (pH: 7,5) y cloroformo. Se precipitó el ADN con etanol puro frío y se resuspendió en 100 µl de buffer TE (10mMTris –HCl pH 8,0 / 1 mM EDTA pH 8,0). La obtención de ADN se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa 1% teñidos con Bromuro de etidio visualizados a través de un transiluminador de luz ultravioleta.

3.9 Análisis del TCR γ por PCR

El ADN purificado a partir de biopsias de pacientes refractarios se utilizó para el análisis de clonalidad del infiltrado linfocitario (Mc Carthy KP y col., 2002, Diss T y col., 1995). Éste está basado en la amplificación de la cadena γ del TCR (TCR- γ). Se realizaron reacciones de PCR múltiples (“múltiplex”) utilizando un conjunto de primers 5’ homólogos a las regiones variables (V) y primers 3’ homólogos a los segmentos de unión o joining (J) del TCR γ que abarcan en conjunto todos los posibles reordenamientos de la

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

región V-J de estas cadenas, figura E.

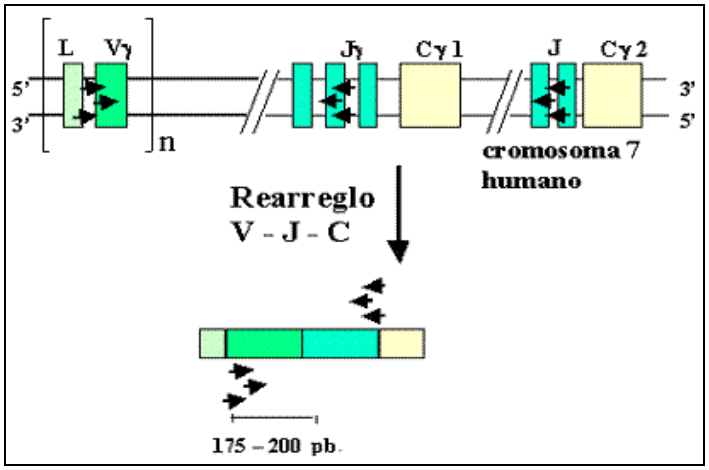


Figura E. Estrategia para la detección de poblaciones clonales.

El conjunto de primers permite detectar todos los posible rearreglos de la cadena y del TCR. Esta PCR multiplex permite inferir la expansión de uno o unos pocos clones de LT predominantes.Las puntas de las flechas indican la ubicación de los " primers".

La reacción de PCR se realizó en un volumen de 50 µl que contiene sulfato de amonio 16,6 mM, Tris-HCl 67 mM pH8,8; β-mercaptoetanol 10 mM, MgCl2 2 mM, gelatina 200µg/ml, dNTPs 200 µM cada uno, primers 0,5 µM cada uno y 1 U de Taq Polimerasa (Promega). Las condiciones de temperatura fueron 90´´a 94ºC, 90´´ a 54ºC y 2´ a 72ºC, en un termociclador PTC-100 TMMJ Reserch (MJ reserch Inc, Watertown, CT). Los productos de amplificación fueron analizados en geles de agarosa 2,5 % o en geles de poliacrilamida 6% teñidos con Bromuro de Etidio (10mg/ml), luego de su separación electroforética en buffer TBE1X durante 30´ a 50V ó 1-2 h a 50V, respectivamente. Las reacciones de PCR se realizaron con concentraciones crecientes de ADN en un rango de 1-16 µg.

Se utilizó ADN de la línea celular Molt-4, proveniente de una leucemia aguda linfoblástica T humana como control positivo de amplificación. Como control negativo se realizaron reacciones de PCR sin templado. En todos los casos se realizó la amplificación del gen HLA- DRβ1 previa al análisis del TCR-γ como control de calidad del ADN obtenido a partir de las biopsias y de la sangre analizada. Los resultados de este control permitieron validar los resultados obtenidos específicamente para la amplificación del TCR-γ.

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en los ensayos de PCR se listan en la tabla E.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Primer	Secuencia 5'→ 3'
1. V2, V8	ACTCCTACAACTCCAG/AGGTTG
2.V3	ACGTCTCCACCGCAAGGGATG
3. V4	ACTCCTACACCTCCAGCGTTG
4. J1.3, J2.3	AAGTGTTGTTCCACTGCCAAA
5. J1.1, J2.1	AGTTACTATGAGCT/CTAGTCCC
6. J1.2	TGTAATGATAAGCTTTGTTCC
7. PSP-49	GCCGCTGCACTGTGAAGCTCTC
8. Amp-A	CCGGATCCTTCGTGTCCCCACAGCACG

TABLA E. Secuencia de primers utilizados para la amplificación del TCR-γ (1-6) y del gen DRß1 (secuencias 7-8). (Algara P y col., 1994)

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El GraphPad Prism© software (GraphPad, San Diego, CA, USA) fue utilizado para todos los análisis estadísticos. Los resultados fueron expresados como el promedio ± el error estándar de la media (SEM). Para comparar los valores obtenidos entre dos grupos se realizó (siempre y cuando los datos se ajustaran a la distribución Gaussiana) el test paramétrico de Student´s a dos colas, no pareado o pareado, según corresponda. Cuando los valores no seguían la distribución de Gauss, se realizó el test Mann-Whitney U a dos colas (para muestras no pareadas) o el test Wilcoxon (para muestras pareadas). Para las comparaciones entre tres grupos se realizó un test de ANOVA con mediciones repetidas (muestras pareadas) y post test de Bonferroni´s. Se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$.

5. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El estudio fue aprobado por los Comités de Ética de los respectivos hospitales y se obtuvieron los consentimientos informados de todos los pacientes.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

RESULTADOS

1- Marcadores de activación celular en células mononucleares de sangre periférica

1.1 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMPS)

A partir de 10 ml aproximadamente de sangre de cada grupo de pacientes, se aislaron las CMPS utilizando gradientes de Ficoll Hypaque (Ver Metodología). Se estudiaron 20 individuos control adultos (Controles Ad), 6 controles pediátricos (Controles Ped), 20 pacientes celíacos adultos (Cel Ad) y 10 pacientes celíacos pediátricos (Cel Ped) para el análisis de inmunofenotípico de moléculas de activación en CMPS en condición basal, frente a la estimulación con anti-CD3 así como el análisis de la modulación de las mismas por medio de la incorporación de citoquinas.

1.2 Expresión marcadores de activación CD45RO, CD25, CD30 y OX40 en CMSP en condición basal

Para el análisis fenotípico se eligió la población linfoide, en base a las características celulares de tamaño y complejidad observada por CF, figura 1. Una vez escogida la población linfocitaria, se seleccionó una región correspondiente a la LT CD3+, donde se hizo el estudio de los marcadores de activación celular, figura 2. El estudio de los marcadores de activación celular se realizó en la población linfoide y dentro de los LT CD3+.

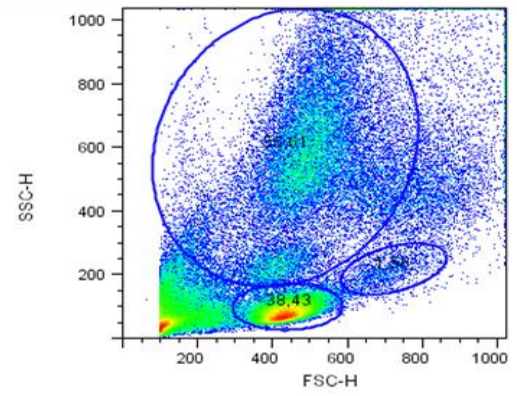


Figura 1: Gráfico de dot plot. Se indican las de diferentes regiones en base al tamaño y la de granularidad celular.

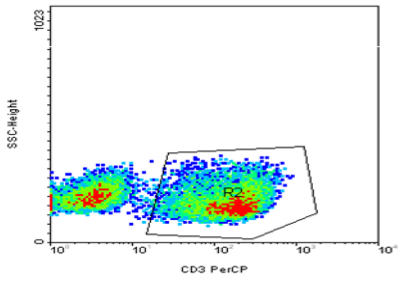


Figura 2: Gráfico de dot plot. Se indica la región LT CD3^{+} considerada para el análisis de marcadores activación

En la Tabla A se muestran los resultados obtenidos luego del análisis de los siguientes grupos experimentales: Controles Ad, Cel Ad y Cel Ped. Se expresan los porcentajes de

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

cada subpoblación celular relativos al total de LTCD3+. No hemos podido realizar este análisis en controles Ped. Se observó una diferencia significativa en el porcentaje basal de células de CD3+CD45RO+ entre pacientes Cel Ad y controles, pero no así entre Cel Ped y Cel Ad. Los porcentajes de células CD3+CD25+ y CD3+CD69+ no difirieron entre los tres grupos en estudio. En ningún caso se observaron células positivas CD3+CD30+ ni CD30+OX40+ en condición basal.

Subpoblación	Controles Ad (n)	Cel Ad (n)	Cel Ped (n)
$CD3^+CD45RO^+$	40,6 ± 1,2 (20)	47,5 ± 1,7 (20)*	45,0 ± 1,0 (10)
$CD3^+CD25^+$	18,0 ± 3,0 (20)	14,0 ± 2,0 (20)	15,0 ± 1,5 (10)
$CD3^+CD69^+$	5,0 ± 1,2 (10)	4,0 ± 0,7 (10)	6,0 ± 1,3 (5)
$CD3^+CD30^+$	-	-	-
$CD3^+OX40^+$	-	-	-

Tabla A: Expresión basal de CD45RO, CD25, CD69, CD30 y OX40 en CMPS en individuos controles y pacientes celíacos.

Los porcentajes son expresados como la media ± SEM. (n): número de muestras analizadas. El análisis estadístico se determinó mediante el test- t de Student´s a dos colas.* $p<0.05$, vs. controles.

1.3 Expresión de los marcadores de activación CD45RO, CD25, CD30 y OX40 luego de la activación mitogénica con anti-CD3

Se estudió la expresión de cada una de estas moléculas en función de tiempo luego de la activación mitogénica de CMSP provenientes de pacientes Cel Ad y controles Ad con el mitógeno anti-CD3, figura 3.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

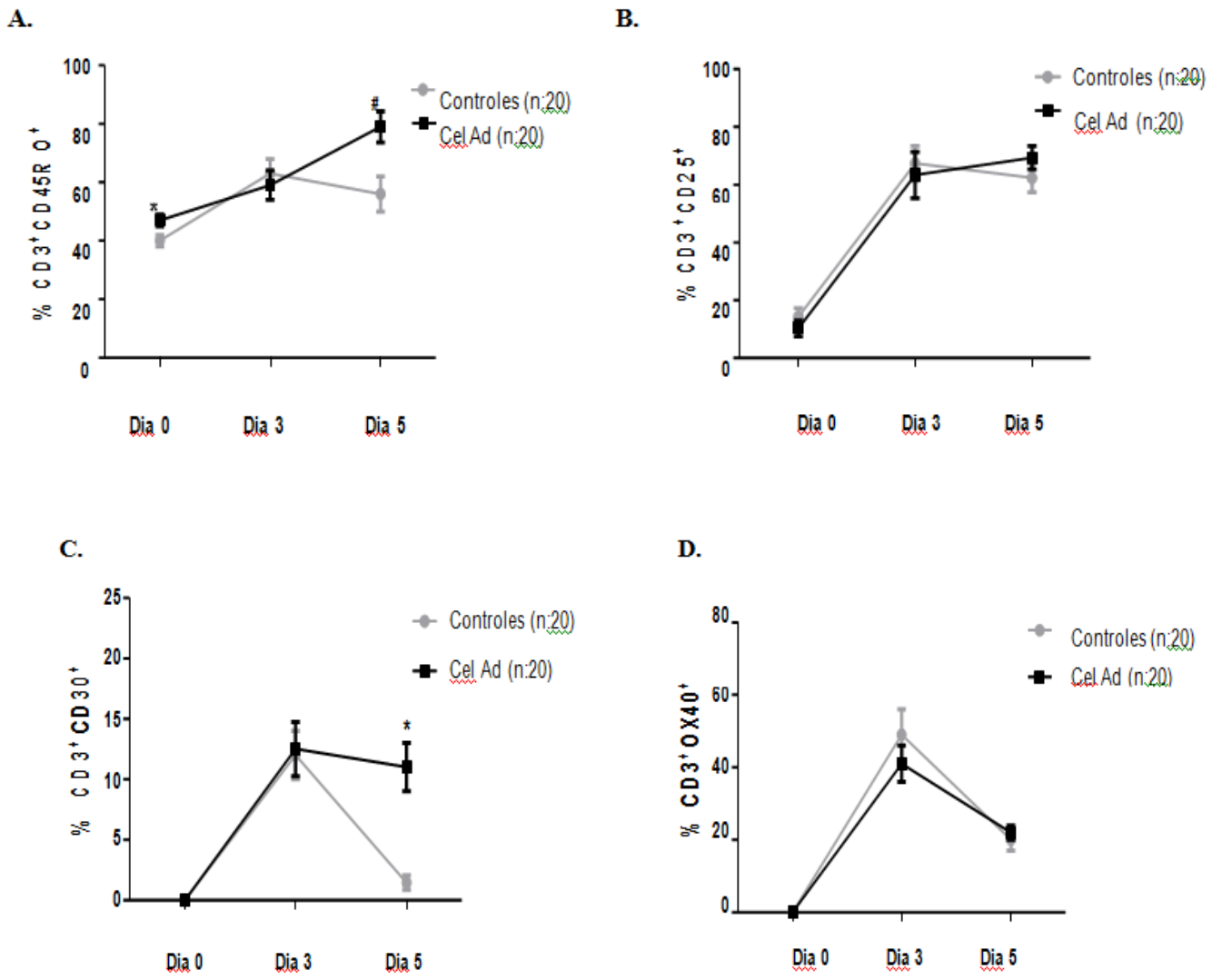


Figura 3: Cinética de expresión de las moléculas CD45RO (A), CD25 (B), CD30 (C) y OX40 (D) en LTCD3^{+} estimulados con anti-CD3. Los porcentajes son expresados como la media ± (SEM),n: número de muestras analizadas. El análisis estadístico se determinó mediante el test- t de Student´s a dos colas.

Figura 3A: *p= 0,0035; Cel vs. Co. $^{\#}$p= 0,043 Cel vs. Co

Figura 3C: *p= 0,0063; Cel vs. Co.

La cinética correspondiente a las subpoblaciones CD3+CD25+ y CD3+OX40+ generadas en respuesta a anti-CD3 no difirió entre controles y pacientes Cel Ad durante el período de tiempo evaluado (figura B y D). Al quinto día de estimulación se observó el máximo porcentaje para las subpoblaciones CD3+CD25+ y CD3+CD45RO+, encontrándose además un aumento significativo sólo en el caso de la subpoblación CD3+CD45RO+ en los pacientes Cel, figura 3 A. Estas subpoblaciones comienzan a disminuir en ambos grupos luego del sexto día de cultivo (datos no mostrados).

La subpoblación CD3+CD30+ difirió entre controles y Cel al quinto día post- estimulación. En ese punto, el porcentaje de células CD3+CD30+ mantuvo el nivel alcanzado al tercer día post-

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

estimulación en CMSP provenientes de pacientes Cel, pero no en los controles. Dada la cinética de expresión de las subpoblaciones CD3+CD25+ y D3+CD45RO+, debe destacarse que la disminución de la subpoblación CD3+CD30+ en los controles no sería debida a una reducción en la población de células activadas.

Los porcentajes alcanzados por las respectivas subpoblaciones analizadas luego de cinco días de estimulación se detallan en la tabla B.

Subpoblación	Controles Ad (n:20)	CelAd (n:20)
$CD3^+CD45RO^+$	55,8 ± 6,5	79,9 ± 5,3*
$CD3^+CD25^+$	75,0 ± 5,0	73,0 ± 3,0
$CD3^+CD30^+$	1,4 ± 0,5	10,8 ± 2,3*
$CD3^+OX40^+$	20,0 ± 3,0	22,0 ± 2,0

Tabla B: Expresión de CD45RO, CD25, CD30 y OX40 en blastos T luego de 5 días de estimulación con anti- CD3.

Porcentajes expresados como la media ± SEM. n: número de muestras analizadas. El análisis estadístico se determinó mediante el test- t de Student´s a dos colas.* $p<0.05$ vs. controles.

1.4 Caracterización fenotípica de las subpoblaciones CD3+CD30+ y CD3+OX40+

A fin de caracterizar estas subpoblaciones celulares, analizamos su fenotipo con respecto a la expresión de dos marcadores de activación, CD45R0 y CD25. Aunque no se ha podido realizar la marcación triple CD30/ CD25/ CD45RO, observamos una ajustada correlación entre los porcentajes de células CD45RO+CD30+ y CD25+CD30+. Los resultados obtenidos nos permiten inferir que la subpoblación CD3+CD30+ expresaría tanto CD45RO como CD25. La figura 4 muestra el análisis representativo a un paciente Cel Ad y un control.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

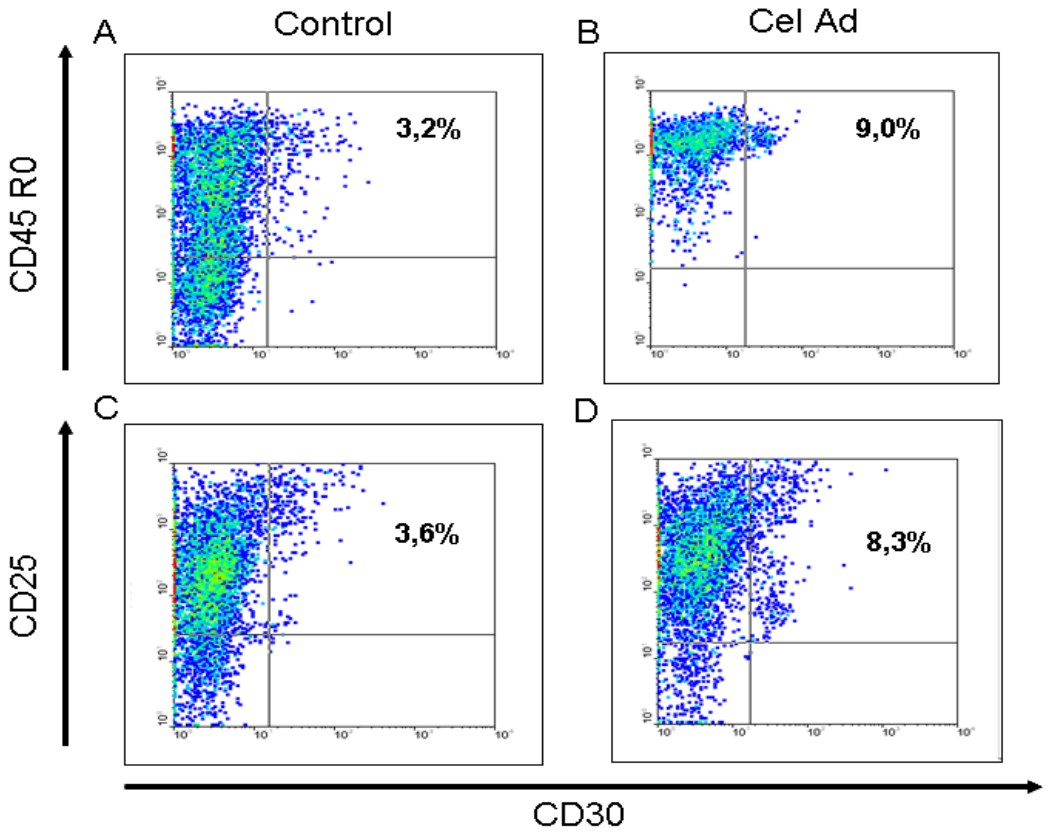


Figura 4: Análisis de la expresión de CD30 en las subpoblaciones CD45RO$^+$ y CD25$^+$.
Expresión de CD30 dentro de la subpoblación de blastos CD3$^+$CD45RO$^+$ (A y B), o CD3+CD25$^+$ (C y D) obtenidos luego de 5 días de estimulación con el mitógeno. Los gráficos corresponden a un individuo control y a un paciente Cel Ad representativos respectivamente.

Por otro lado, la expresión de OX40, evaluada luego de 3 días de estimulación mitogénica, también se observa dentro de la subpoblación de células activadas CD3+CD25+, figura 5. La molécula OX40 se expresa dentro de la subpoblación CD3+CD45RO+ (datos no mostrados).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

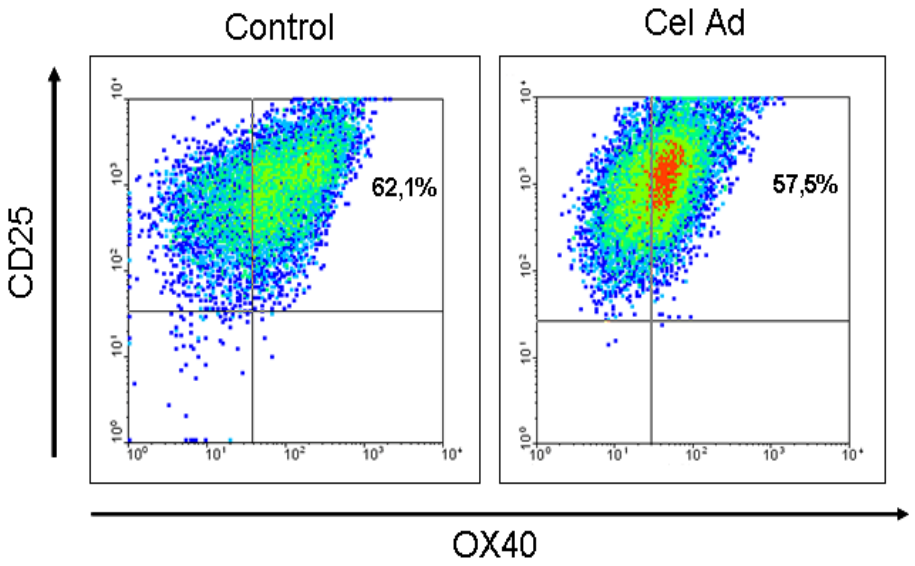


Figura 5: Análisis de la expresión de OX40 en la subpoblación CD25 luego de 3 días de estimulación con anti-CD3.
Expresión de OX40 dentro de la subpoblación de blastos CD3+CD25+ obtenidos luego de 3 días de estimulación.
Los gráficos corresponden a un individuo control (A) y a un paciente Cel Ad (B) representativos.

1.5 Estudios de proliferación celular

El estudio de proliferación celular luego de 3 y 5 días de estimulación con el mitógeno anti-CD3 en CMSP fue realizado en individuos control y pacientes adultos, figura 6. No se han encontrado diferencias significativas entre ambos grupos al tercer día de estimulación. Al quinto día, la proliferación desciende en ambos grupos (datos no mostrados).

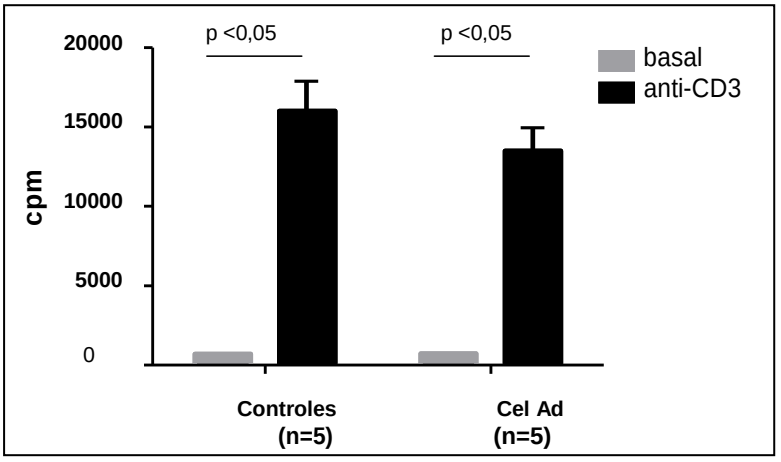


Figura 6: Proliferación celular de CMPS en respuesta a la estimulación mitogénica.
Respuesta proliferativa expresadas en cuentas por minuto (cpm) de blastos procedentes de pacientes Cel Ad e individuos control al tercer día de estimulación. Las barras indican la media ± SEM. n: número de muestras analizadas. El análisis estadístico se determinó mediante el test- t de Student´s pareado a dos colas.

1.6 Modulación de CD30 y OX40 por IL-15 en blastos T activados

Una vez obtenido los blastos CD3+CD30+ y CD3+OX40+ se decidió investigar el efecto modulatorio de IL-15 e IL-2 sobre las subpoblaciones de células CD3+CD30+ y CD3+ OX40+ independientemente.

Modulación de CD30 por IL-15:

Este estudio fue realizado en poblaciones pediátrica y adulta y sus resultados se observan en las figuras 7A y 7 B (población adulta) o 7C y 7D (población pediátrica).

Las CMPS fueron evaluadas a tiempo “cero” en CMSP frescas (Basal), a día 3 post-estímulo mitogénico (Blastos) y a día 6 post-estímulo mitogénico pero en presencia de IL-15 durante los últimos 3 días (Blastos + IL-15). Se observó un incremento en el número de células CD3+ CD30+ frente al estímulo con IL-15 en todos los grupos, sin embargo este incremento sólo fue significativo en controles y Cel Ad con respecto a los blastos obtenidos en ausenta de IL-15.

En los controles Ped la tendencia no pudo ser analizada estadísticamente debido al escaso número de pacientes evaluados.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

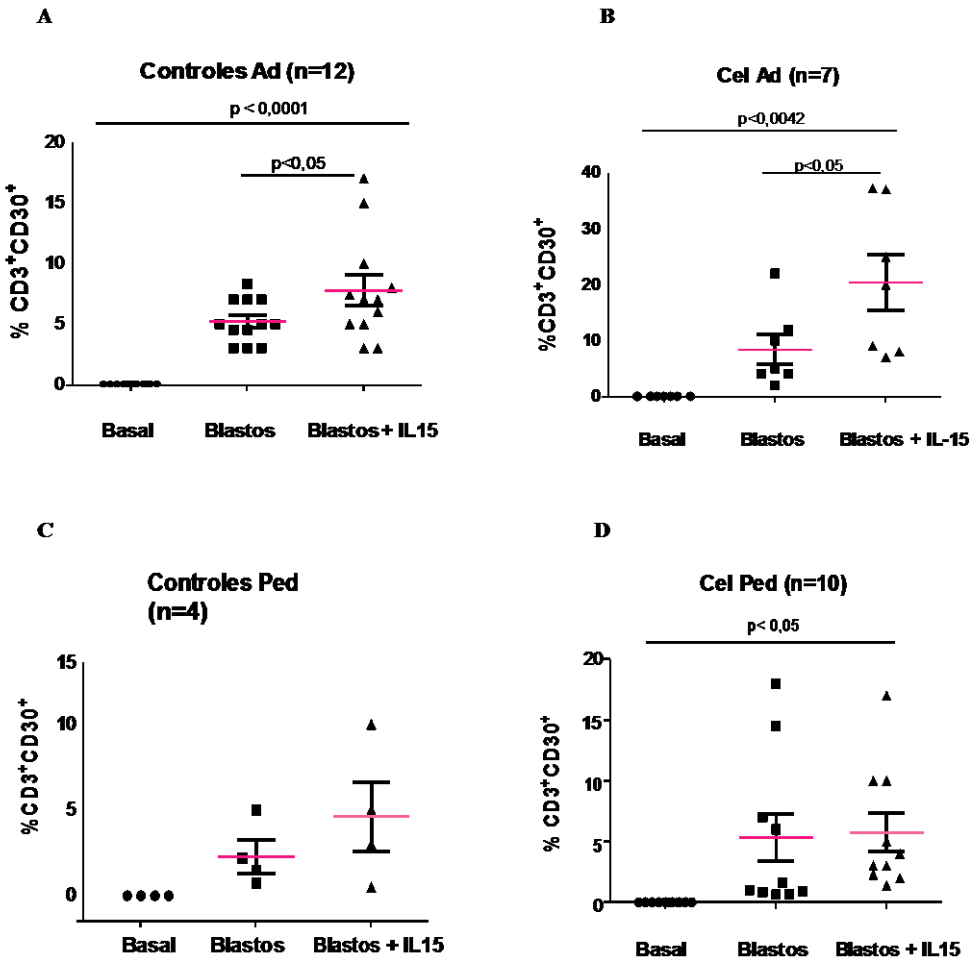


Figura 7: Efecto modulatorio de IL-15 sobre la subpoblación de blastos T CD30$^+$ en individuos adultos y pediátricos.

Porcentaje de células CD3$^+$CD30$^+$ en condición basal y en blastos con o sin IL-15. Las barras horizontales representan los valores promedio ± SEM; n: número de muestras. A y B. Gráficos correspondientes a grupo control y Cel Ad, respectivamente. C y D. Gráficos correspondientes a grupo control y Cel Ped, respectivamente.
El análisis estadístico se determinó utilizando el test de Anova de medidas repetidas con post-test de Bonferroni.

Seguidamente, comparamos el % de blastos T CD30+ generados en presencia de IL-15 en controles y Cel (3er columna, figura 7A y 7B) Sorprendentemente, se observó un mayor porcentaje de células CD3+ CD30+ luego de la estimulación con IL-15 en blastos provenientes de pacientes Cel Ad respecto de los respectivos individuos control, figura 8A.

Tales diferencias no fueron observadas en la población pediátrica (figura 8B).

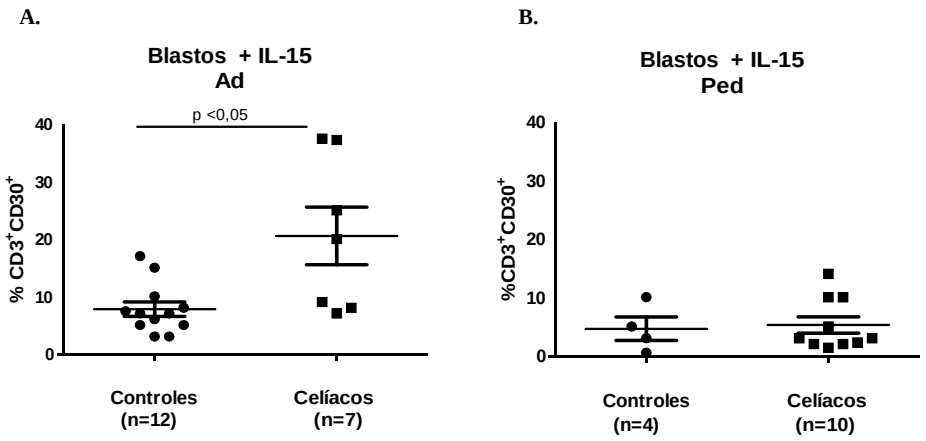


Figura 8: Expresión de CD30 en blastos estimulados con IL-15 en pacientes Cel Ad y Ped.
Se indican los valores promedio ± SEM; n: número de muestras. A: Adultos; B: Pediátricos. El análisis estadístico se realizó mediante el test- t de Student´s a dos colas.

Las figuras 9 A y B ilustran los resultados comparativos del análisis por CF del porcentaje de blastos T CD30+ obtenidos luego del cultivo en presencia o ausencia de IL-15 para un individuo control (A) y un paciente Cel Ad (B) representativos.

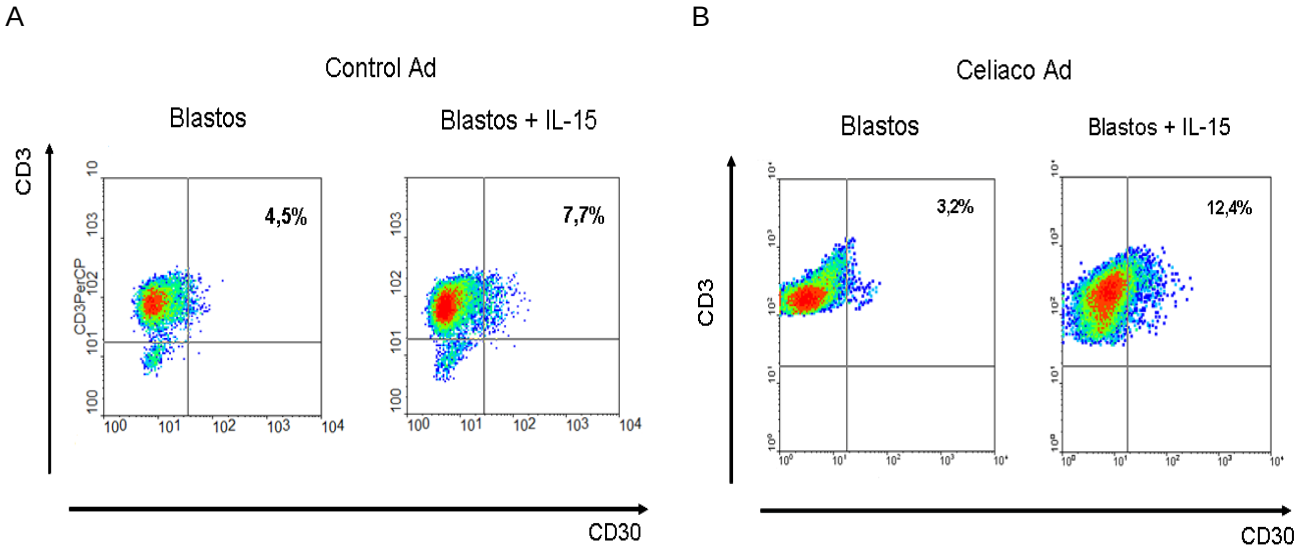


Figura 9: Análisis comparativo de la expresión de CD30 en blastos T en presencia o ausencia de IL-15. Los gráficos corresponden a (A) control adulto y (B) paciente Cel Ad.

Mediante el análisis individual del incremento de blastos T CD30+ se pudo evaluar la magnitud del efecto modulatorio de IL-15 sobre la expresión de CD30. Este análisis consistió en el cálculo de un índice de estimulación (IE) para cada paciente:

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

IE (Índice de Estimulación): % de blastos T CD30+ post- estimulación con anti-CD3 + IL-15

% de blastos T CD30+ post-estimulación con anti-CD3

La figura 10 muestra los IE en controles y pacientes Cel Ad (A) y en controles y pacientes Cel Ped (B). El incremento en el porcentaje de células CD3+CD30+ en pacientes Cel Ad es mayor que en el grupo control, pero no así en la población pediátrica. El análisis individual dentro de cada grupo de pacientes demostró que IL-15 modula la expresión de CD30 en ambos grupos, pero el efecto es de igual magnitud en pacientes y controles pediátricos, figura 10B.

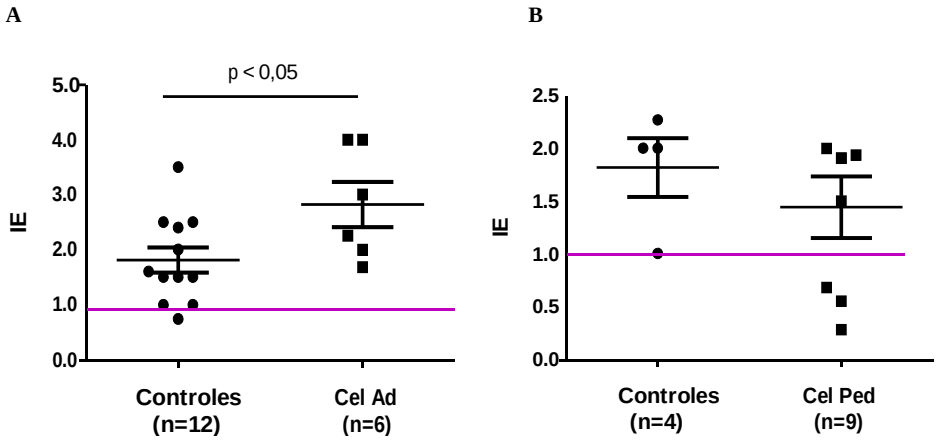


Figura 10: Índice de estimulación por IL-15 en blastos T CD30+.
Se indican los valores promedio ± SEM, n= número de muestras. La línea horizontal trazada a la altura del valor "1" (sobre el eje de las ordenadas) permite visualizar el incremento (por encima de la línea auxiliar) o la disminución (por debajo de la línea auxiliar) en cada muestra independientemente evaluada antes y después del agregado de IL-15 a los blastos T.
A: Pacientes adultos; B: Pacientes pediátricos. El análisis estadístico se determinó mediante el test- t de Student´s a dos colas.

Modulación de OX40 por IL-15:

Los efectos modulatorios de IL-15 sobre OX40 difieren de los efectos descriptos para esta misma citoquina sobre CD30. Para todos los grupos analizados se encontró una disminución en la subpoblación de blastos CD3+ OX40+ como consecuencia del agregado de IL-15. Los resultados para los grupos de: Controles Ad (A), Cel Ad (B), Controles Ped (C) y Cel Ped (D) se describen en la figura 11.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

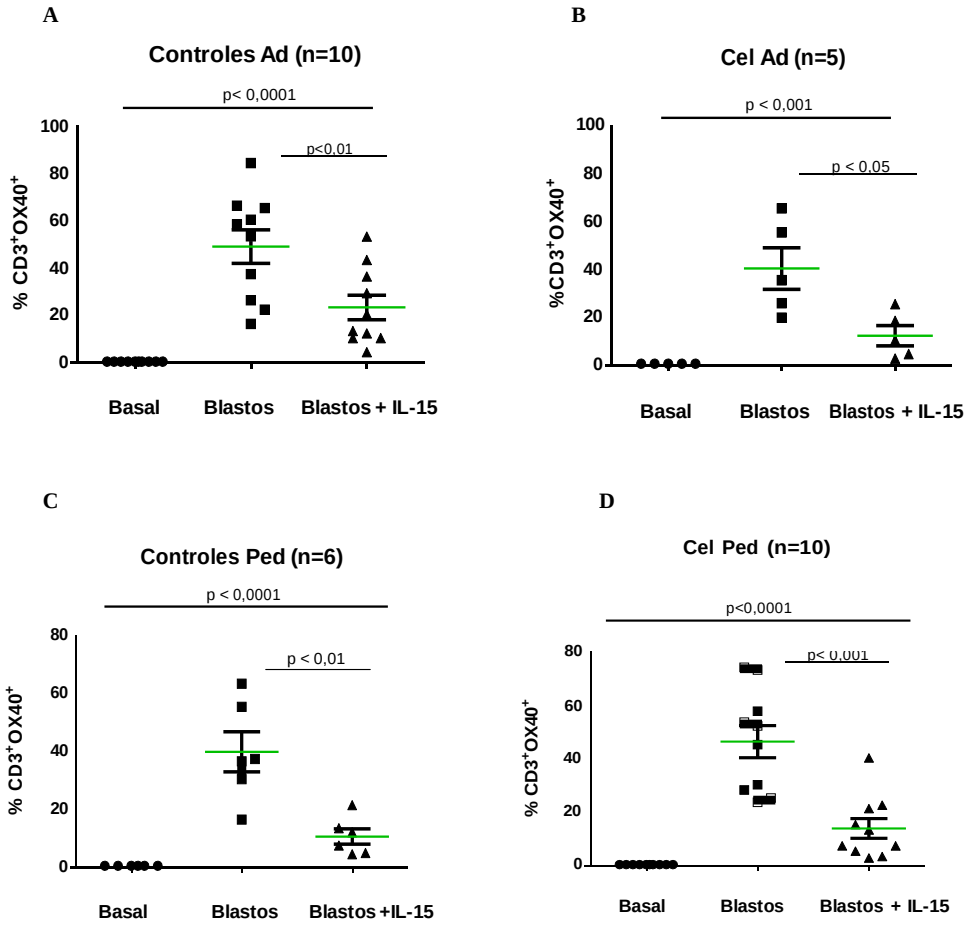


Figura 11: Efecto modulatorio de IL-15 sobre la subpoblación de blastos T OX40+ en individuos adultos y pediátricos.
Porcentaje de células CD3+OX40+ en condición basal y en blastos con o sin IL-15.
Las barras horizontales representan los valores promedio ± SEM; n: número de muestras.
A y B: Gráficos correspondientes a los grupos control y Cel Ad, respectivamente.
C y D: Gráficos correspondientes a los grupos control y Cel Ped, respectivamente.
El análisis estadístico se determinó utilizando un test de Anova de medidas repetidas con post-test de Bonferroni.

Cuando se comparó el efecto de IL-15 sobre blastos CD3+OX40+ en Cel Ad y controles, se observó una disminución significativa en el porcentaje de células CD3+OX40+ en el grupo de pacientes Cel, figura 12 A. Sin embargo, al analizar la población pediátrica no encontramos un efecto modulatorio diferencial para IL-15 sobre la expresión de OX40 en blastos, figura 12 B.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

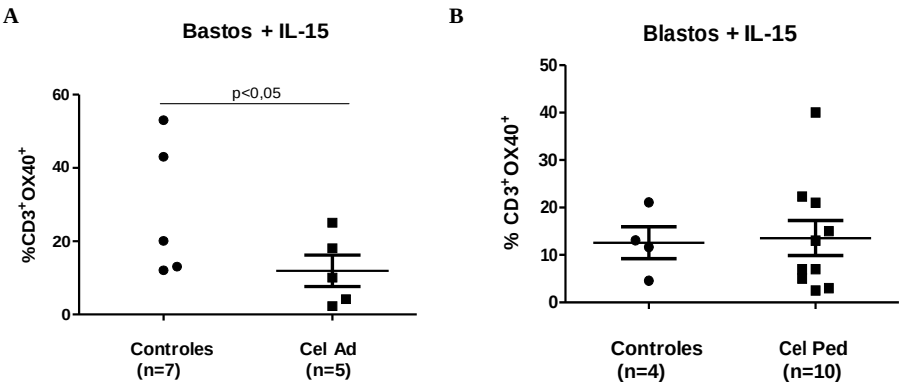


Figura 12: Expresión de OX40 en blastos estimulados con IL-15 en pacientes adultos y pediátricos.
Se indican los valores promedio ± SEM; n= número de muestras.
A.: Adultos; B: Pediátricos. El análisis estadístico se determinó por el test- t de Student´s a dos colas.

Las figuras 13 A y B ilustran los resultados comparativos del análisis por CF del porcentaje de blastos T OX40+ obtenidos luego del cultivo en presencia o ausencia de IL-15 para un individuo control Ad (A) y un paciente Cel Ad (B) representativos.

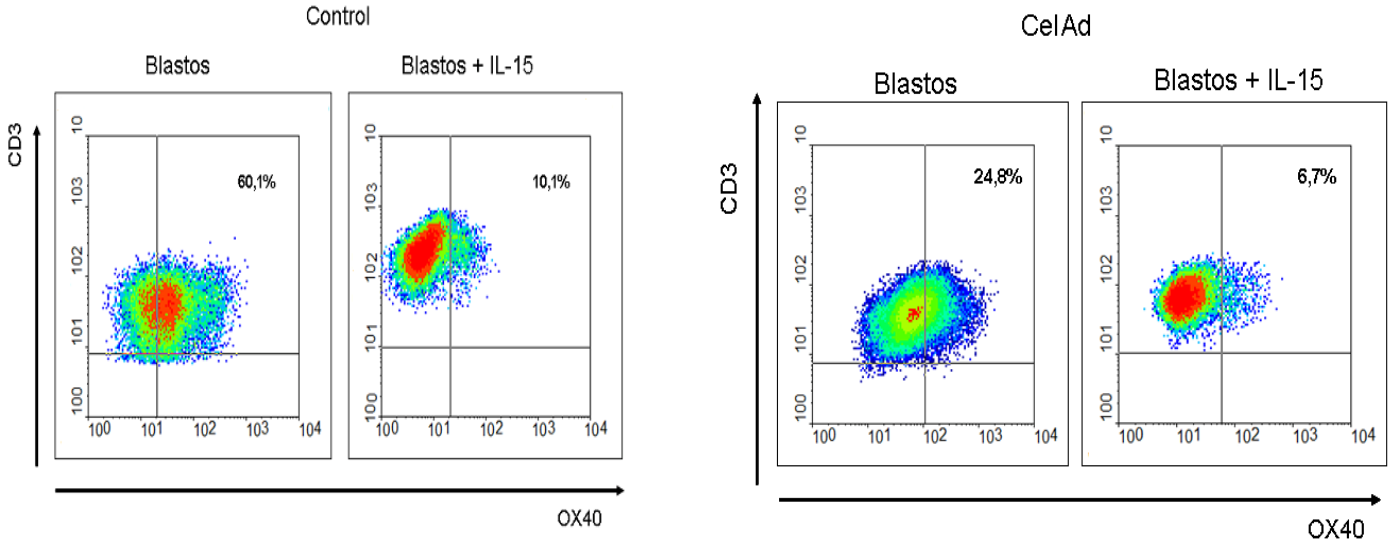


Figura 13: Análisis comparativo de la expresión de OX40 en blastos T en presencia o ausencia de IL-15. Los gráficos corresponden a (A) control adulto y (B) paciente Cel Ad.

Los IE calculados en este caso se detallan en las figuras 14A (pacientes adultos) y 14B (pacientes pediátricos), respectivamente y reflejan la disminución observada para la subpoblación CD3+OX40+ luego del estímulo con IL-15.

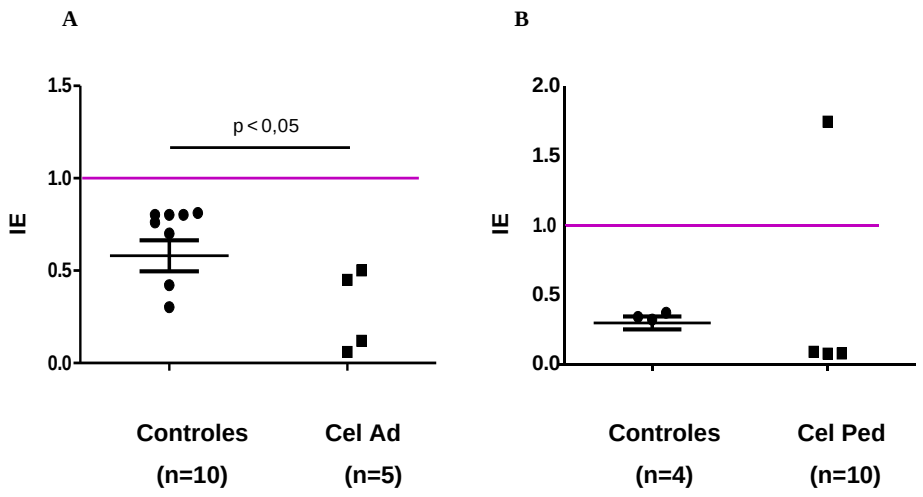


Figura 14: Índice de estimulación por IL-15 en blastos T OX40+.
Se indican los valores promedio ± SEM, n: número de muestras.
La línea horizontal trazada a la altura del valor "1" (sobre el eje de las ordenadas) permite visualizar el incremento (por encima de la línea auxiliar) o la disminución (por debajo de la línea auxiliar) en cada muestra independientemente evaluada antes y después del agregado de IL-15 a los blastos T.
A: Pacientes adultos; B: Pacientes pediátricos. El análisis estadístico se determinó mediante el test- t de Student´s a dos colas.

Con el fin de determinar el requerimiento de IL-15 como intermediario en la modulación de CD30 y OX40 durante la activación mitogénica, repetimos los ensayos en presencia de un anticuerpo neutralizante anti-IL-15. Las CMPS provenientes de cuatro individuos control Ad fueron estimuladas con anti-CD3 por tres días en presencia de anti- IL-15 con el fin de bloquear la producción de IL-15 endógena que pudiera ocurrir durante el cultivo. Los resultados obtenidos demostraron una reducción en el número de los blastos CD3+CD30+ en presencia del mitógeno y el anticuerpo neutralizante (3,00 ± 0,54) comparado tanto con el control de isotipo MOPC-21 (11,00 ± 2,30), como con blastos obtenidos solo en presencia del mitógeno anti-CD3 (10,75 ± 1,90) o en presencia de rIL-15 (18,25 ± 5,60), figura 15A. En el caso de OX40 la presencia simultánea del anticuerpo anti- IL15 y el anticuerpo anti-CD3 impidió la disminución del porcentaje de blastos CD3+OX40+ inducida por IL-15, demostrando entonces que IL-15 contribuye a la disminución de la subpoblación de blastos OX40+, figura 15 B.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

A

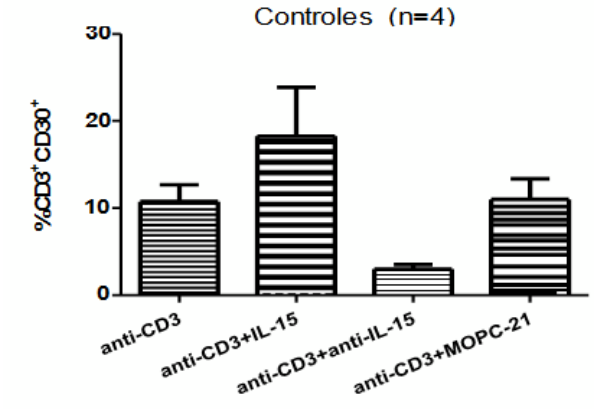
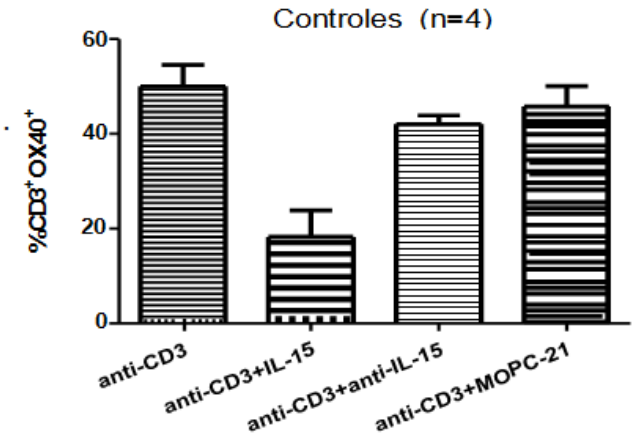


Figura 15: Efecto del anticuerpo neutralizante anti-IL15 sobre la expresión de CD30 y OX40. Las CMSP fueron estimuladas por 3 días en presencia de anti-CD3, –anti-CD3 + rIL-15, anti-CD3 + anti IL-15 y anti-CD3 + MOPC-21. Se realizaron 3 experimentos independientes, por triplicado. Las barras indican los porcentajes promedio ± SEM, n: número de muestras provenientes de células $CD3^{+}CD30^{+}$ (A) y $CD3^{+}OX40^{+}$ (B) para un experimento representativo.

B



1.7 Modulación de CD30 y OX40 por IL-2 en blastos T activados

Debido a que la citoquina IL-2 comparte funciones biológicas con IL-15, y además modula positivamente a la molécula CD30 (Ver Introducción) se ha querido comparar los efectos modulatorios de ambas citoquinas sobre las moléculas CD30 y OX40. Para ello se utilizaron cultivos de blastos T (obtenidos mediante el mismo esquema experimental mencionado para IL-15), provenientes de individuos control. Obtuvimos un similar porcentaje de blastos CD3+CD30+ luego de la estimulación con IL-2 o con IL-15 durante tres días. Así también, observamos que IL-2 posee los mismos efectos que IL-15 sobre la subpoblación de blastos CD3+OX40+, figura 16.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

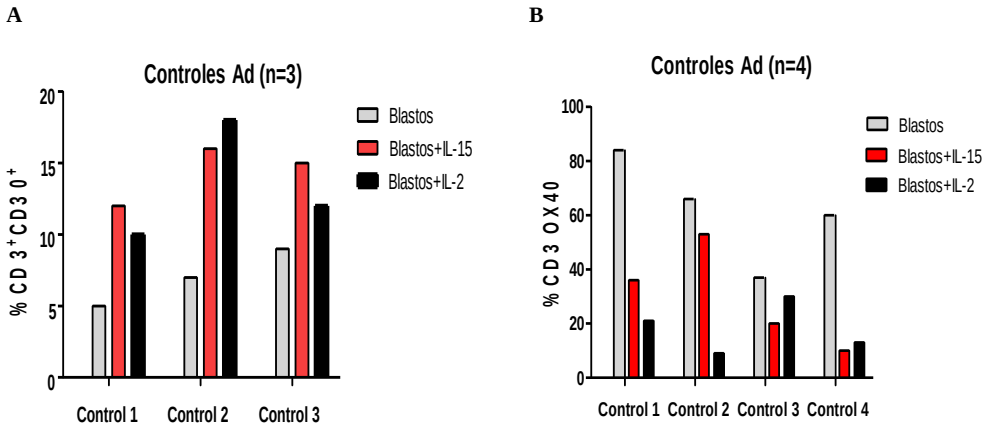


Figura 16: Análisis comparativo de los efectos modulatorios de IL-15 e IL-2 en blastos CD3+ CD30+ y CD3+ OX40+ provenientes de individuos control.
Se evaluaron blastos CD3+CD30+ (A), y blastos CD3+OX40+ (B). n: número de muestras.

1.8 Cuantificación de citoquinas INF- γ e IL-4 en sobrenadantes de cultivo de blastos T activados

Mediante la técnica de ELISA se detectó y cuantificó la secreción de estas dos citoquinas en los sobrenadantes de cultivo de blastos, provenientes de individuos control y pacientes Cel Ad, figuras 17 y 18, respectivamente. Tanto en controles como en pacientes Cel Ad, la producción de INF-γ aumenta como consecuencia de la activación mitogénica, siendo despreciable la producción de esta citoquina en condiciones basales. La IL-15 no afectó la producción de IFN-γ. Debe destacarse que en este caso, la citoquina detectada en los sobrenadantes proviene tanto de blastos T CD30+/- como de blastos OX40+/-, siendo técnicamente imposible en este caso determinar el origen del IFN-γ, figura 17.

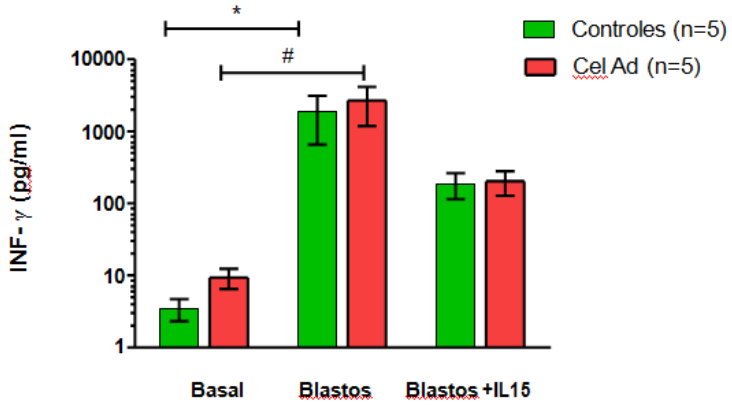


Figura 17: Producción de INF-γ en sobrenadantes de cultivo.
Se expresan los valores de INF- γ obtenidos en sobrenadantes de cultivo de CMPS en condición basal y en cultivo de blastos con o en ausencia de IL-15.
Se indican los valores promedio ± SEM, n: número de muestras. *p<0.05 Controles: blastos vs. basal.
# p<0.05 Cel: blastos vs. basal. El análisis estadístico se determinó mediante el test t de Student´s a dos

Como en el caso de IFN-γ, tanto en controles como en pacientes Cel Ad, la producción de IL-4 aumenta como consecuencia de la activación de blastos T, siendo despreciable la producción de esta citoquina en condiciones basales. IL-15 tampoco afectó la producción de IL-4 en los blastos T, figura 18.

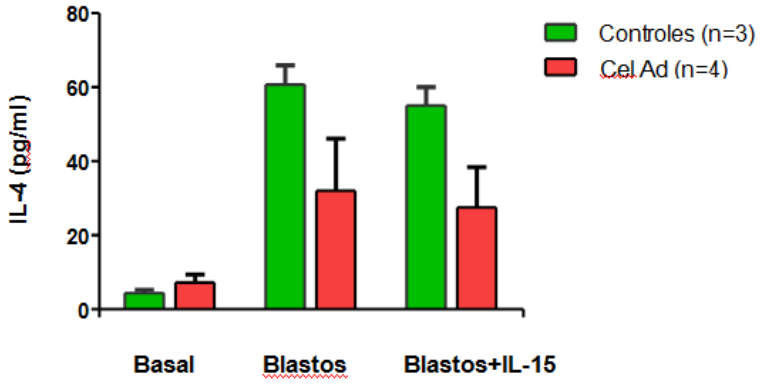


Figura 18: Producción de IL-4 en sobrenadantes de cultivo.
Se expresan los valores de IL-4 obtenidos en sobrenadantes de cultivo de CMPS en condición basal (sin estímulo) y en cultivo de blastos con o en ausencia de IL-15.
Se indican los valores promedio ± SEM; n= número de muestras. El análisis estadístico se determinó mediante el test t de Student´s a dos colas.

1.9 Detección intra-citoplasmática (i.c.) de citoquinas (INF-γ e IL-4) en blastos CD3+CD30+ y CD3+OX40+

Se evaluó la presenciade INF- γ e IL-4 en blastos CD3+CD30+ y CD3+ OX40+ respectivamente, procedentes de pacientes Cel y Controles Ad. La figura 19 muestra el procedimiento seguido en un paciente Cel Ad representativo, donde se detallan los porcentajes de células positivas para la expresión de INF-γ e IL-4 relativos al porcentaje total de células CD30 y OX40 que se han obtenido respectivamente.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

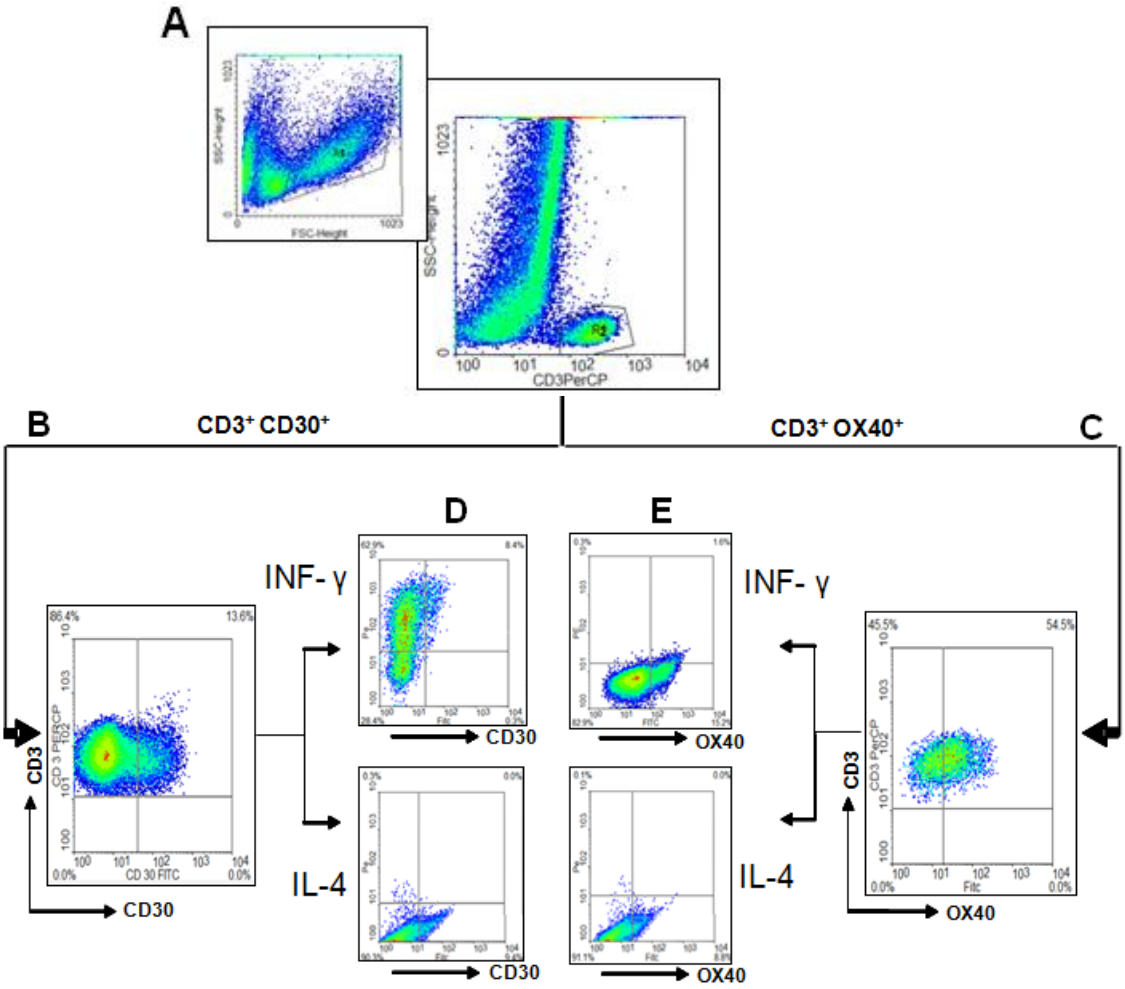


Figura 19: Perfil de producción de citoquinas intracitoplasmáticas en blastos T CD30+ y OX40+. Se muestra el análisis correspondiente a un paciente Cel Ad representativo indicando los porcentajes de blastos productores de INF γ o IL-4 respectivamente.
A: Se seleccionó una primer ventana R1 según características de tamaño (FSC) y complejidad (SSC) celular y a partir de ésta se escogió la población SSC vs CD3+ (región R2)
B y C: Porcentaje de células totales CD3+CD30+ y CD3+OX40+, respectivamente.
D: Porcentaje de células CD3+CD30+ que expresan INF γ (izq arriba) e IL-4 (izq abajo). E: Porcentaje de células CD3+OX40+ que expresan INF γ (der arriba) e IL-4 (der abajo).

En la figura 20 se grafican los datos compilados del análisis de expresión i.c de citoquinas en controles y Cel Ad. Se compara la proporción de blastos T CD30+ y OX40+ productores de INF- γ e IL-4 dentro del grupo control. Cómo se observa, estas proporciones son similares, figura 20A. La misma comparación fue realizada en el grupo Cel en el que, sin embargo, la proporción de blastos T CD30+ productores de INF- γ es mayor a la de blastos T productores de IL-4, figura 20 B.

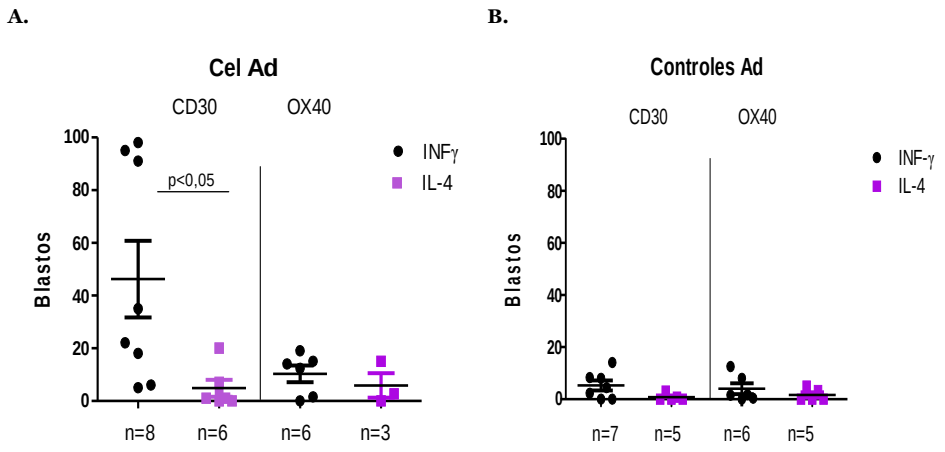


Figura 20 A y B: Perfil de citoquinas i.c en blastos CD3+CD30+ y CD3+OX4O+.
Porcentaje de blastos productores de INF- γ e IL-4 relativos al porcentaje total de blastos CD3+CD30+ y CD3+OX40+ (tomados como el 100%) en individuos control Ad (A) y pacientes Cel Ad (B).
Se indican los valores promedio para cada conjunto de datos correspondientes a IFN-γ o IL-4 según se corresponda como el promedio ± SEM, n: número de muestras. El análisis estadístico se determinó mediante el test- t de Student´s a dos colas.

Realizamos a continuación un análisis comparativo del porcentaje de blastos T CD30+ INF-γ+ y blastos T CD30+ IL-4+ entre los mismos grupos de individuos control y pacientes Cel Ad, figura 21 A. Observamos un mayor porcentaje de blastos T CD30+ productores de IFN-γ (44,04 ± 15,11 vs 5,29 ± 1,90) en el grupo de pacientes Cel, sin embargo no hubo diferencias en el porcentaje de blastos T CD30+ productores de IL-4. No encontramos diferencias en cuanto a la producción de INF-γ+ ni de IL-4+ en blastos T OX40+ entre los pacientes Cel y los individuos control, figura 21 B.

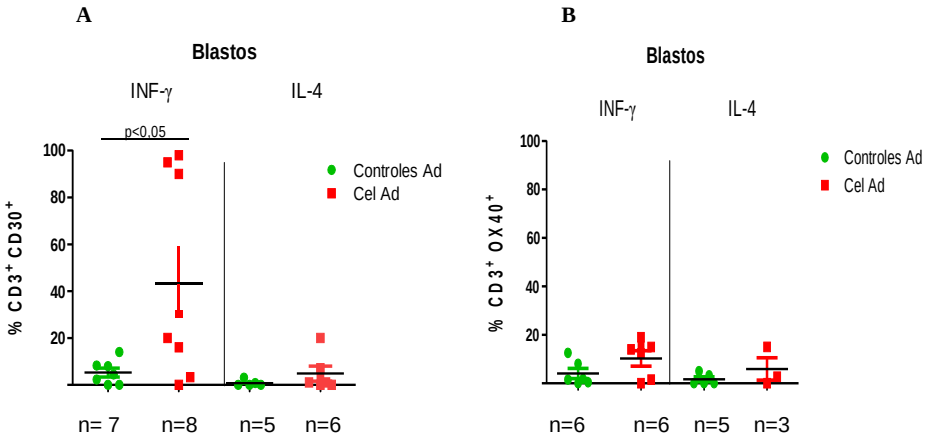


Figura 21: Estudio comparativo de la producción i.c de INF-γ e IL-4 en pacientes Cel Ad e individuos control.
Datos compilados de los porcentajes de blastos T CD3+CD30+ (A) y CD3+OX40+ (B) que expresan INF-

γ o IL-4. Se indican los valores promedio ± SEM, n: número de muestras. El análisis estadístico se determinó mediante el test- t de Student´s a dos colas.

Luego se determinó el efecto de IL-15 sobre las subpoblaciones de blastos T CD30+ INF-γ+ y de blastos T OX40+ INF-γ+, respectivamente. Para esto, se incorporó IL-15 a blastos obtenidos al tercer día de estimulación (siguiendo el mismo esquema experimental con que se analizaron anteriormente las subpoblaciones de blastos T), y se compararon los porcentajes de células INF γ+ obtenidos antes y después del agregado de esta citoquina. En la figura 22 se observa que ninguna de dichas subpoblaciones fueron moduladas por IL-15. La producción de IL-4 en blastos T CD30+ y T OX40+ como tampoco fue modificada por IL-15 (datos no mostrados).

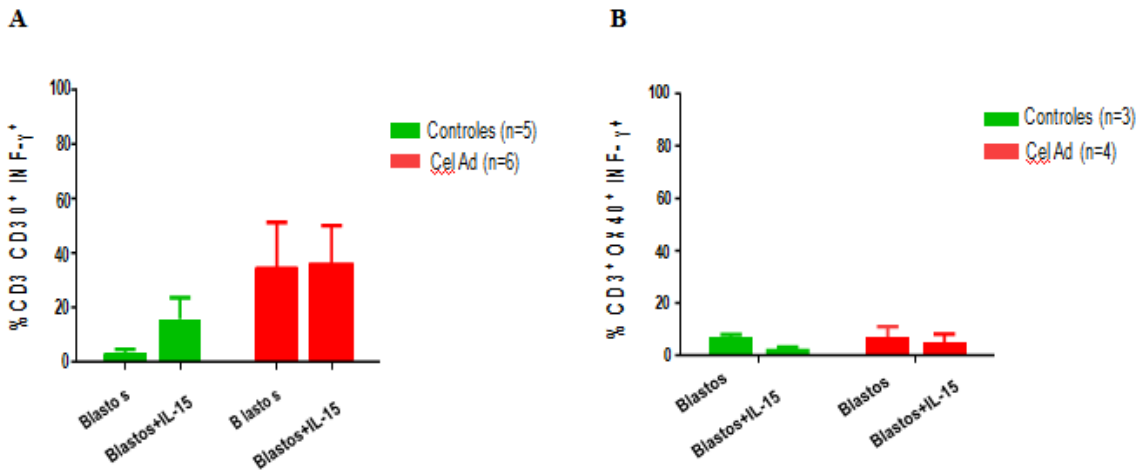


Figura 22: Efecto modulatorio de IL-15 sobre la expresión de INF- γ en la subpoblación de blastos T CD30+ u OX40+. Porcentajes de blastos T CD30+ (A) y OX40+ (B) que expresan INF- γ en ausencia o presencia de IL-15. Se indican los valores promedio ± SEM, n: número de muestras.
El análisis estadístico se determinó mediante el test- t de Student´s pareado a dos colas.

En un escaso número de pacientes Cel Ped (n= 4) estudiados, tampoco encontramos diferencias en la producción de INF-γ ni de IL-4 en ninguna de las dos subpoblaciones de blastos (datos no mostrados).

Resumen de Resultados

¾ Observamos un mayor porcentaje basal de células CD3+CD45RO+ en Cel Ad, pero no así en los porcentajes de células CD3+CD25+ y CD3+CD69+ en ninguno de los grupos (Tabla A).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

¾ La fracción de blastos que expresa CD30 al quinto día post-estimulación con el mitógeno anti-CD3 es mayor en pacientes Cel Ad respecto a controles, figura 3.

¾ IL-15 indujo un incremento diferencial en la subpoblación de blastos T CD30+ en pacientes Cel Ad, pero no en los Cel Ped (figura 8 y 10). La subpoblación de blastos T OX40+ disminuyó diferencialmente, luego de la estimulación con IL-15 en Cel Ad, pero no en Cel Ped (figura 12 y 14). Atribuimos a IL-15 la modulación tanto de blastos T CD3+CD30+ como de CD3+OX40+ (figura 15).

¾ No se modificó la producción de IFN-γ ni de IL-4 en los sobrenadantes de cultivos de blastos en presencia de IL-15 en ninguno de los grupos (figura 17 y 18).

¾ La proporción de blastos T CD30+ productores de INF- γ es mayor a la de blastos T CD30+ productores de IL-4 en el grupo de pacientes Cel Ad (figura 20 B), y estas proporciones no difieren entre sí en los individuos control (figura 20 A). Por otro lado, los pacientes Cel Ad evidenciaron mayor porcentaje de blastos productores de INF-γ en la subpoblación CD3+CD30+ que los individuos control (figura 21 A). La expresión de INF-γ e IL-4 en blastos T CD3+OX40+ fue similar entre pacientes Cel y controles (figura 21 B).

¾ La producción de INF-γ e IL-4 en blastos CD3+CD30+ como CD3+OX40+ no fue modulada por IL-15 (figura 22).

Discusión de resultados

En este capítulo hemos analizado las características fenotípicas de CMSP en cuanto a la expresión de distintos marcadores de activación celular. Hemos focalizado nuestro estudio en CD30 y OX40, dos moléculas pertenecientes a la familia del receptor de TNF (TNF−R). Investigamos su modulación por IL-15 e IL-2, y caracterizamos el perfil de citoquinas producidas por subpoblaciones celulares que expresan dichas moléculas bajo diferentes condiciones experimentales.

En primer lugar hemos observado, en población adulta, que el porcentaje de LT periféricos que expresan CD45RO en condiciones basales es mayor en pacientes Cel respecto a individuos control, resultados que concuerdan con datos previamente publicados en la literatura (Kerttula y col., 1995; Di Sabatino y col., 1998). Las células T de memoria poseen una larga vida media y permanecen arrestadas en un estado de interfase por períodos prolongados. Estas células manifiestan una rápida activación frente a la reiterada estimulación tanto con antígenos propios como no propios, lo que les confiere un

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

estado de activación crónica (Tough y Sprent 1994). Por lo tanto el incremento observado en la subpoblación de células CD45RO+ en condiciones basales, en pacientes celíacos tanto adultos como pediátricos, podría reflejar un estado de mayor activación linfocitaria sistémica que podría ser resultado de la estímulación antigénica continua inducida por la dieta no restringida en gluten. A diferencia de los datos reportados en la literatura (Di Sabatino y col. , 1998), no hemos observado que tal estado de activación crónica se reflejase similarmente en un mayor porcentaje de células CD3+CD25+ en el grupo de pacientes celíacos respecto de los individuos control.

Como se mencionó en la Introducción, la expresión de las moléculas CD30 y OX40 requiere la activación previa de los LT periféricos, y es modulada positivamente en respuesta al mitógeno anti-CD3 entre otros estímulos (Ellis T M y col., 1993, Tarkowski M y col., 2002.). Sin embargo, observamos diferencias entre la regulación de la expresión de ambas moléculas por mitógenos durante la activación de los LT. Si bien ambas registraron su máxima expresión al tercer día post-estimulación de CMSP con anti-CD3, el porcentaje de células OX40+ observado superó al de los blastos T CD30+ generados durante los cinco días post-estimulación evaluados. Las subpoblaciones de blastos T CD30+ y OX40+ alcanzaron su máxima expansión en el momento de máxima proliferación del cultivo, sin embargo la subpoblación de blastos T CD30+ persiste al quinto día post-estimulación en las CMSP provenientes de los pacientes celíacos, simultáneamente con la disminución observada de su actividad proliferativa. Esto proveería a las CMSP de pacientes celíacos de una subpoblación de LT CD30+, con una capacidad adicional de respuesta frente a estímulos regulatorios.

Aunque el análisis de la producción de IFN-γ e IL-4 por las diferentes subpoblaciones no nos permite determinar una posible producción intracitoplasmática simultánea de ambas citoquinas, éste arroja algunas diferencias interesantes entre pacientes y controles en cuanto al perfil Th1/Th2 de las subpoblaciones CD3+CD30+ y CD3+OX40+ respectivamente. Así, observamos un mayor porcentaje de células productoras de INF- γ con respecto a las productoras de IL-4 en blastos CD3+CD30+ (no así en blastos CD3+OX40+) en pacientes celíacos pero no en controles, lo que coincide, a nivel de esta subpoblación, con el desarrollo de la respuesta inflamatoria predominantemente Th1 demostrada en el contexto de esta patología.

A través del análisis comparativo de las subpoblaciones de blastos T CD3+OX40+ provenientes de pacientes celíacos y controles, por el contrario, observamos proporciones similares tanto de células productoras de INF-γ como de IL-4. Esto significaría que la subpoblación identificada como CD3+OX40+ está similarmente sujeta a ambas vías de diferenciación en pacientes e individuos control, sin predominio neto de los perfiles Th1/Th2 evaluados.

Hemos descripto que una subpoblación de blastos T CD30+ persiste aumentada en los

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

cultivos de CMSP provenientes de pacientes celíacos luego de 5 días de estimulación mitogénica in vitro. Por un lado este efecto podría ser una consecuencia de la mayor producción de IFN-γ en CMSP, observada tanto en condición basal (Hansson A y col. , 1999) como por nosotros, en la subpoblación de blastos CD3+CD30+ en respuesta a la activación mitogénica. Por otro lado, este efecto persistente podría ser reflejo (in vitro) de una posible contribución al desarrollo de la patología celíaca in vivo. El hipotético efecto indirecto del IFN-γ sobre la persistencia de blastos T CD30+ en los cultivos provenientes de pacientes celíacos, podría estar mediado por IL-2 y/o IL-15. El IFN-γ no estimula directamente la proliferación de células T in vitro, pero induce la producción de IL-2 e IL-15 (Grabstien y col., 1994; Waldmann y Tagaya 1999; Ma y Boone, 2000). Esta última citoquina comparte con IL-2 algunas cadenas de sus receptores, así como su función estimuladora de la proliferación in vitro de células T. Dentro de los mecanismos probablemente involucrados en el papel de IFN-γ como promotor indirecto de la persistencia de blastos T CD3+CD30+ en pacientes celíacos, se han mencionado en la Introducción, el efecto de IL-2 sobre la activación de células CD45RO+CD30+ (Ellis T M y col., 1993) y la generación de células CD30+ a través de un mecanismo autócrino mediado por IL-15 en blastos activados (Alzona y col. , 1995; Periolo y col. , 2010). Debido a ello sugerimos entonces, que la posible liberación de IL-2 y/o IL-15 por células CD30+INF-γ + en respuesta a la estimulación mitogénica, podría favorecer la persistencia de las células CD3+CD30+ observada en cultivos de CMSP provenientes de pacientes celíacos.

Al estudiar si efectivamente IL-2 e IL-15 pueden contribuir a la expansión de células CD3+CD30+, observamos que tanto IL-15 como IL-2 modulan positivamente el porcentaje de células CD3+CD30+ en pacientes y controles de población pediátrica y adulta. La IL-15 no sólo estimula y promueve la activación de células de memoria CD45RO+ (Kanegane y Tosato 1996) sino que de acuerdo con nuestros resultados, también induce la expresión de CD30 en lo blastos activados. Más aún, este efecto se encuentra diferencialmente incrementado en el grupo de pacientes celíacos activos (Periolo y col., 2010). Sin embargo, resulta difícil determinar la función biológica mediada a través de CD30 en LT debido a que la interacción CD30/CD30L dispara múltiples funciones tales como la disminución de la función T efectora, el direccionamiento de los LT hacia nódulos linfáticos, y el aumento de la susceptibilidad a apoptosis, entre otros (Muta H y col., 2000).

El efecto modulatorio ejercido por IL-15 sobre CD30 cobra mayor relevancia ya que además de la expresión elevada de sus receptores (IL-15R) en células T de memoria y de su regulación positiva luego de la activación del TCR (Zhang y col., 1998), la interacción IL-15/ IL-15R retroalimenta positivamente su producción (Lodolce y col., 2001). Por otro lado, se ha propuesto la existencia de un menor umbral de respuesta inmune frente a IL-15 en pacientes celíacos, en probable correlación con la mayor expresión de su cadena α, en el intestino delgado de pacientes celíacos activos (Bernardo y col., 2008). Si bien

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

no hemos podido estudiar la expresión de IL-15R en los blastos T, el incremento en el porcentaje de células CD45RO+CD30+ inducido por IL-15 en cultivos de pacientes celíacos, podría atribuirse a un fenómeno similar al previamente observado para la expresión de IL-15R en el intestino delgado, o a una retroalimentación mediada por IL-15, y seguida por expansión celular de los blastos T.

Contrariamente al comportamiento diferencial observado para blastos T CD30+ entre pacientes y controles, el porcentaje de blastos T OX40+ disminuyó luego de cinco días de estimulación con el mitógeno anti-CD3 tanto en muestras provenientes de pacientes como de controles. Esta disminución general en el porcentaje de blastos T OX40+ no pudo ser revertida en presencia de IL-15 ni de IL-2. Sin embargo, la magnitud del efecto inducido por IL-15 fue mayor en muestras de pacientes celíacos adultos en comparación con sus controles, sin evidenciarse diferencias dentro de la población pediátrica. Al utilizar un anticuerpo neutralizante anti-IL-15 durante la activación mitogénica se observó que IL-15 contribuyó a la disminución de la subpoblación de blastos OX40+.

Tanto en controles como en pacientes Cel, la activación de CMSP con el mitógeno anti-CD3 aumentó la producción de IFN-γ e IL-4 solubles. Específicamente en los pacientes celíacos, la proporción de blastos T CD30+ productores de INF- γ resultó mayor a la de blastos T productores de IL-4 en respuesta al mitógeno. A pesar del efecto estimulador de IL-15 sobre la transcripción de INF-γ pero no de IL-4 en LT activados reportado previamente (Borger y col. , 1999).,no observamos cambios en la producción de estas citoquinas en respuesta a IL-15 en ninguna de las subpoblaciones de blastos T.

Se ha descripto que IL-7 regula positivamente la expresión de OX40 en LT (Gaspal y col., 2005), y por otro lado se ha observado que la expresión de la cadena α del receptor de IL-7 (IL-7Rα) es menor en LT activados que en vírgenes (Schluns y col., 2000) y que tanto IL-2 como IL-15 son moduladores negativos del mismo (Park y col., 2004; Xue y col., 2002). Podríamos postular entonces, que la disminución de la subpoblación de blastos T OX40+ observada, podría ser consecuencia de un efecto negativo de la IL-15 exógena sobre IL7Rα. Una baja expresión de IL-7Rα podría conferir, además, una desventaja para IL-7R en su competencia con receptores para IL-2, IL-15, IL-4 e IL-21 por la subunidad γc. Esto redundaría en una disminución en la señal promotora de la expresión de OX40 en los blastos T impartida por IL-7.

Por último, el hecho de que la magnitud de la disminución de blastos T OX40+ frente a IL-15 resultara mayor para los pacientes celíacos adultos en comparación con sus controles, reflejaría una interesante diferencia en la regulación de OX40 en el contexto de la patología celíaca, si se tiene en cuenta que OX40 está involucrada en el desarrollo y la homeostasis de los LT reguladores (Treg) (Takeda I y col., 2004). Si además consideramos que existe un efecto supresor de IL-15 sobre las Treg (Ruprecht CR y col., 2005), podríamos inferir entonces un posible déficit tanto en el desarrollo como en la

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

función de las células Treg en el contexto de la EC.

2- Marcadores de activación celular en biopsias de mucosa intestinal

2.1 Análisis por inmunohistoquímica de la expresión de CD30 en la mucosa duodenal

Se evaluó la expresión de CD30 mediante un análisis inmunohistoquímico retrospectivo utilizando tacos de biopsia de ID pertenecientes a 6 individuos control y 6 pacientes Cel Ad.

El patrón de distribución observado para las células CD30+ observado fue idéntico en ambos grupos, con predominio de células CD30+ en la LP, y escasas células CD30+ en el compartimiento epitelial, figura 24.

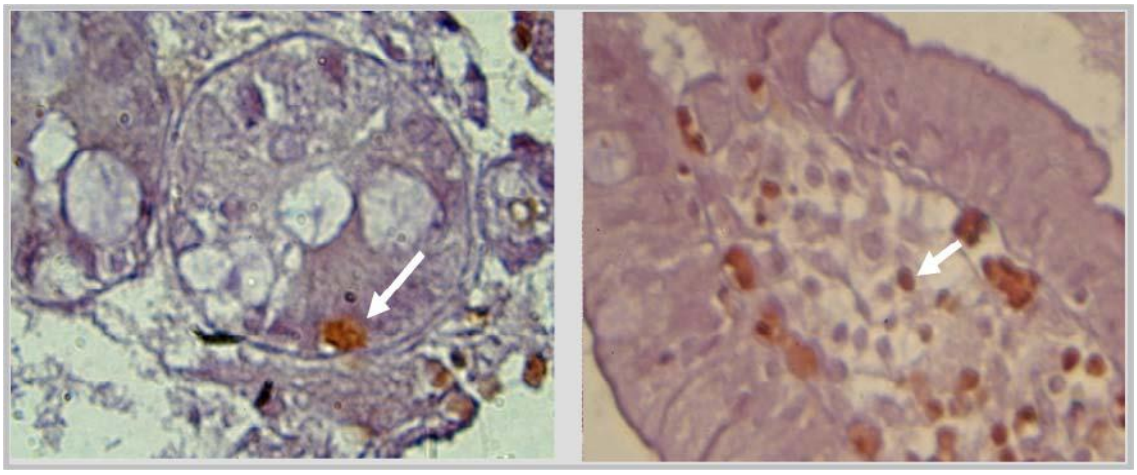


Figura 24: Localización de la molécula CD30 en biopsias duodenales.
Las células en marrón corresponden a LIEs CD30+ (A) y LPLs CD30+ (B) en un paciente Cel Ad representativo. Los cortes histológicos fueron examinados bajo microscopio óptico. Amplificación 1000X.

2.2 Cultivo de biopsias duodenales.

Todos los estudios que se presentan a continuación en este capítulo corresponden al análisis prospectivo utilizando material fresco obtenido por endoscopía, como se indicó en la sección de Materiales y Métodos.

A continuación se presenta el análisis cuantitativo de un grupo de marcadores fenotípicos incluyendo marcadores de activación de LT en el epitelio y en la LP del ID, tanto en condición basal (sin estímulo antigénico) como frente al estímulo con gliadina o IL-15.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Para ello se analizaron muestras provenientes de pacientes Cel Ad, (n=12), controles Ad (n=7), Cel Ped (n=11) y controles Ped (n=5).

2.2.1 Expresión basal de moléculas de activación en LIEs y LPLs: CD25, CD69, CD45RO, CD30 y OX40.

El análisis de las suspensiones celulares obtenidas a partir de biopsias intestinales se realizó mediante CF, el cual nos permitió identificar LIEs y LPLs. En primer lugar se determinó la localización intraepitelial de los linfocitos a través de la detección de CD103, intergrina αεβ7 que caracteriza los LIEs del ID, figura 25.

A. **B.**

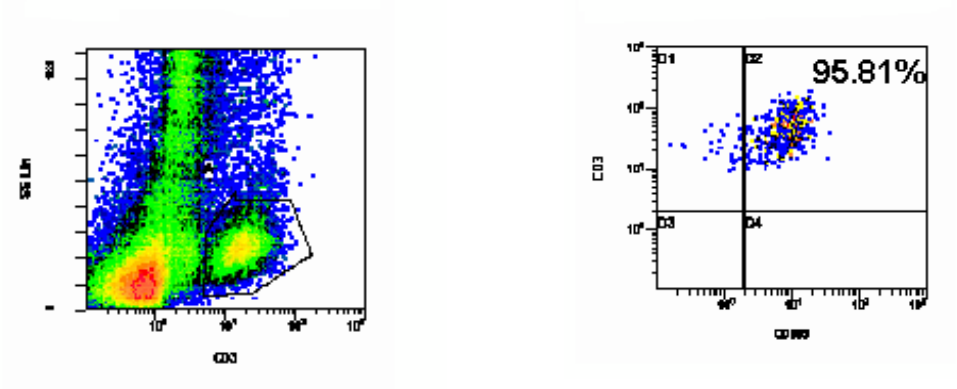


Figura 25: Expresión de CD103 en una suspensión de LIEs en condición basal.

A: Región seleccionada en la población celular según criterio de complejidad celular (SSC) vs CD3. Se obtuvieron 100.000 eventos totales.
B: Expresión de CD103 en LIEs CD3+.

Por otro lado, se realizó un análisis fenotípico de la suspensión de LPLs en una región previamente seleccionada en forma similar que para los LIEs. En la figura 26 se muestra el análisis de la expresión de los marcadores CD69, CD45RO y CD25 en una suspensión de LPLs representativa.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

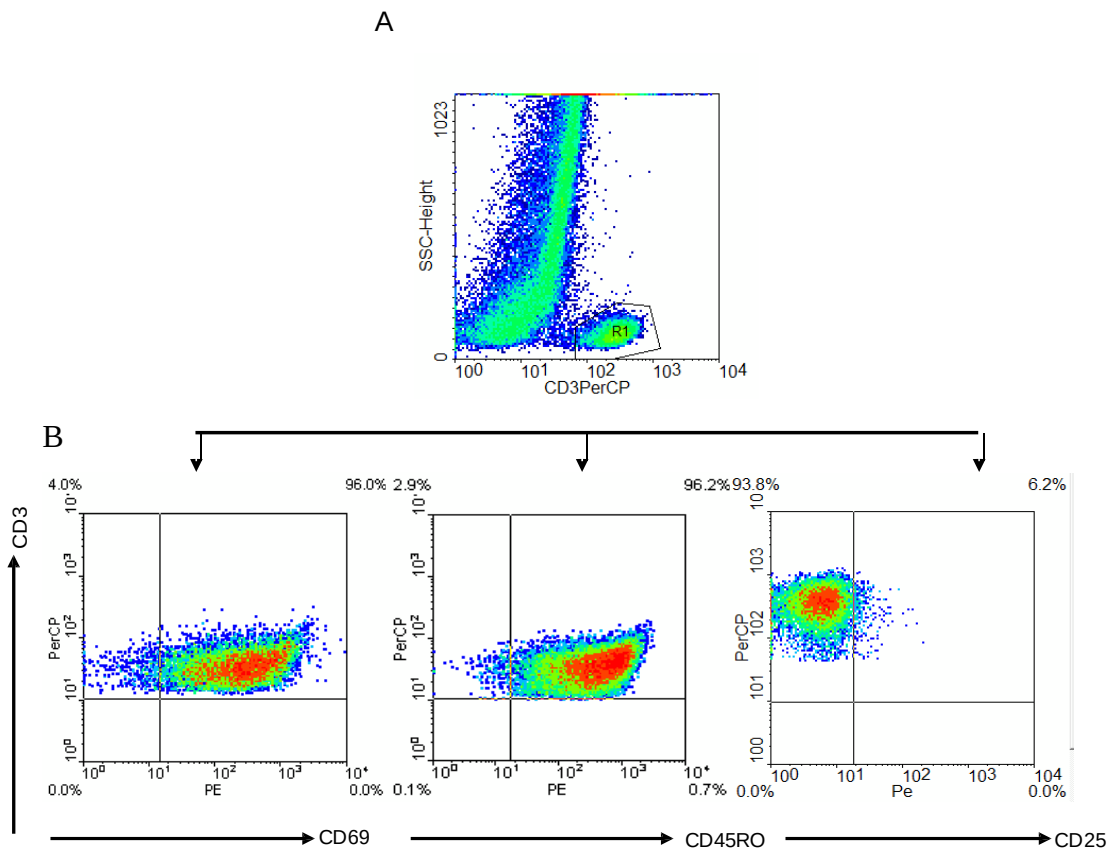


Figura 26: Expresión de marcadores de activación en una suspensión de LPLs proveniente de una biopsia control representativa.
A: La región R1 corresponde a los LTCD3+ y fue obtenida en un gráfico de complejidad celular (SSC) vs. CD3.
B: Porcentaje de células T CD3+ totales (obtenidas de la región R1) que expresan CD69, CD45RO y CD25 respectivamente.

Expresión basal de CD25, CD69 y CD45RO en LIEs y LPLs.

La tabla C compila los datos del análisis de suspensiones celulares de LIEs y LPLs provenientes de pacientes y controles pediátricos y adultos.

Subpoblación	Adultos		Pediátricos	
	Controles (n=7)	Cel (n=12)	Controles (n=3)	Cel (n=11)
LIEs				
$CD3^+CD45RO^+$	90,0 ± 2,1	90,0± 6,3	90,0± 6,3	90,0± 7,0
$CD3^+$ $CD25^+$	5,0 ± 1,3	7,0 ± 4,3	3,0± 4,1	5,0± 2,1
$CD3^+$ $CD69^+$	98,0 ± 2,1	99,0± 4,0	99,0± 5,0	97,0± 7,0

LPLs				
$CD3^+CD45RO^+$	90,0 ± 1,5	90,0± 2,0	90,0± 3,2	90,0± 8,0
$CD3^+$ $CD25^+$	19,0± 3,0	15,0± 3,0	10,0± 4,5	8,0± 4,2
$CD3^+$ $CD69^+$	96,0± 5,2	99,0± 4,0	99,0± 5,6	98,0± 6,0

Tabla C: Expresión de CD45RO, CD25 y CD69 en LIEs y LPLs en pacientes adultos y pediátricos.
Se expresan los promedios ± SEM, n: número de muestras analizadas. El análisis estadístico se determinó mediante el test- t de Student´s a dos colas.

Hemos observado que las moléculas CD45RO y CD69 se expresan en más del 90 % de los LPLs y LIEs en condición basal, mientras que la expresión de CD25 es entre 3 – 7% en LIEs y 8-19% en LPLs para todos los pacientes. No se observaron diferencias significativas entre pacientes y controles para ninguno de los tres marcadores.

Expresión basal de CD30 y OX40 en LIEs y LPLs

A fin de poder identificar funciones relacionadas con la regulación de la homeostasis en LT, nos propusimos evaluar posibles diferencias en la expresión de CD30 y OX40 en las subpoblaciones linfocitarias de la mucosa intestinal (LIEs y LPLs) en Cel Ad y Cel Ped. Tal como ha sido descripto en el capítulo anterior para los blastosT periféricos, encontramos que la expresión de CD30 se encuentra asociada enteramente a células de memoria CD45RO+, figura 27.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

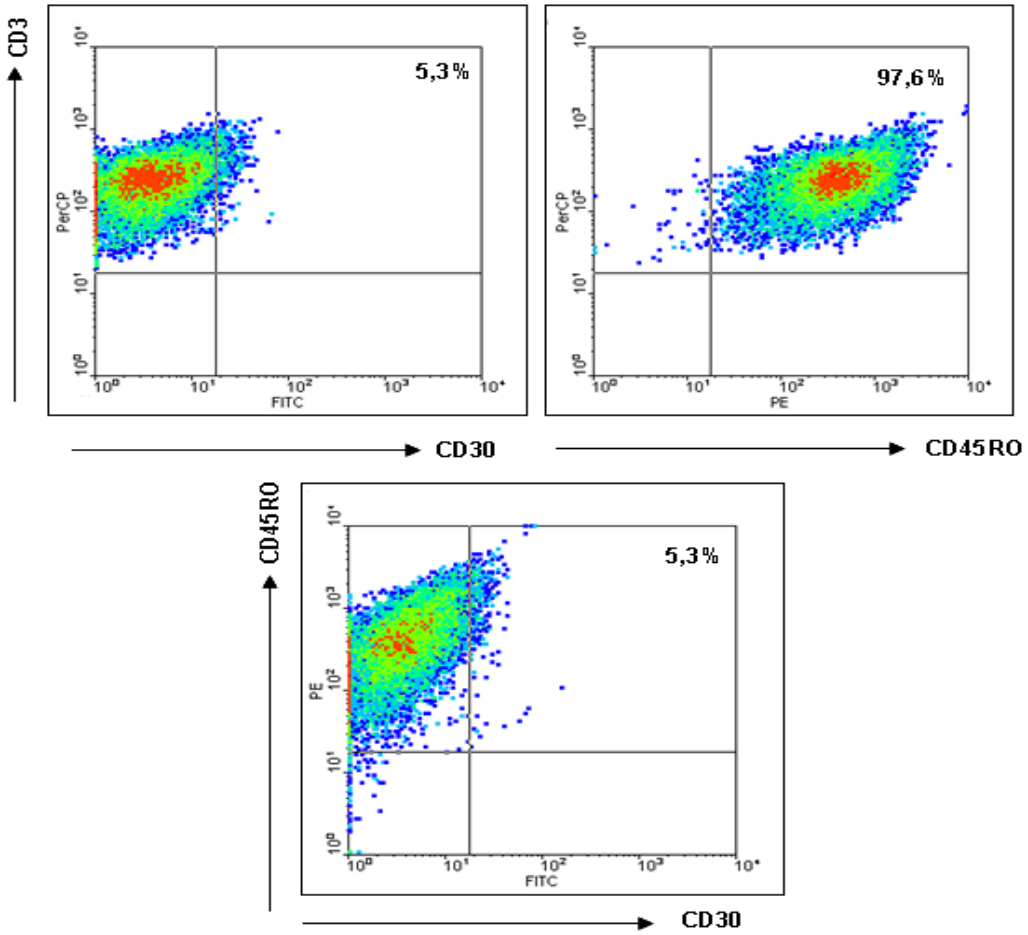


Figura 27: Análisis de CF correspondiente a LPLs provenientes de un individuo control adulto representativo.
A: CD3+ vs. CD30+ ; B: CD3+ vs. CD45RO+ ; C: CD45RO vs. CD30.

Mediante el análisis de la región linfoide previamente seleccionada como se indicó en la figura 26, establecimos la expresión basal de CD30 y OX40 en suspensiones celulares de LIEs y LPLs en muestras provenientes de poblaciones pediátrica y adulta. El porcentaje de LIEs CD3+CD30+ observado fue similar en controles y Cel Ad así como en de controles y Cel Ped (figuras 28 A y C). La única diferencia observada en el análisis comparativo de la expresión de CD30 en la mucosa intestinal consistió en una disminución en el porcentaje de LPLs CD3+CD30+ en suspensiones celulares provenientes sólo de pacientes Cel Ped, (figuras 28 D).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

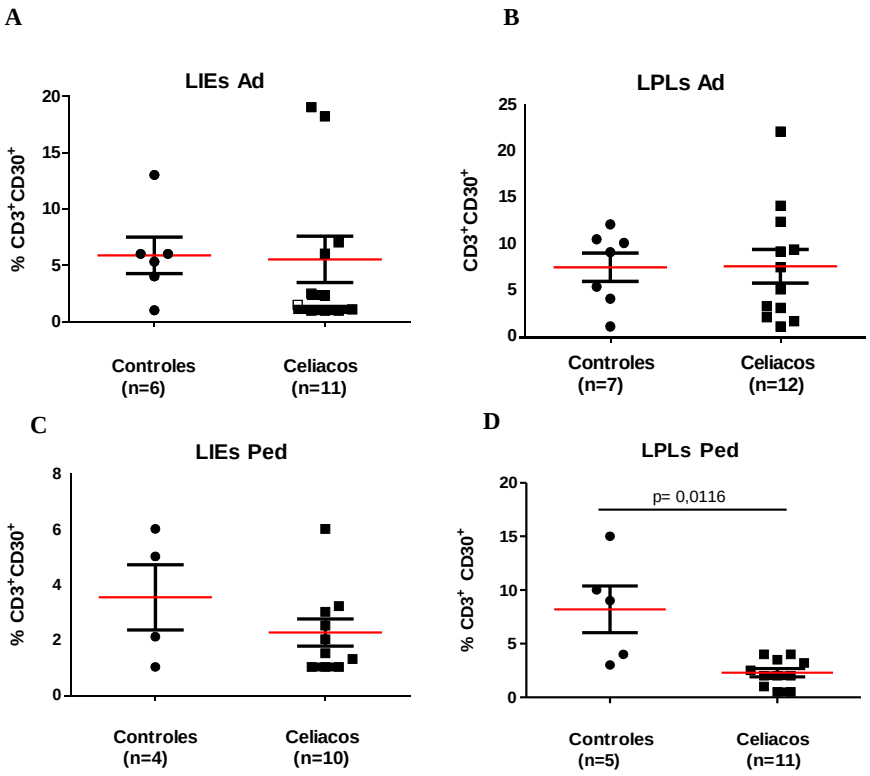


Figura 28: Análisis comparativo de la expresión basal de CD30 en LIEs y LPLs.
Porcentaje de LIEs y LPLs CD3+CD30+ en controles y Cel Ad (A y B) y controles y Cel Ped (C y D), respectivamente. Se indican los valores promedio ± SEM; n: número de muestras. El análisis estadístico se determinó mediante el test- t de Student´s a dos colas.

Por otro lado, el porcentaje de LIEs CD3+OX40+ fue similar en controles Ad y Cel Ad (figura 29 A). Así también, el porcentaje de LPLs CD3+OX40+ fue similar entre controles y Cel tanto de población adulta como pediátrica (figuras 29 B y D). En suma, la única diferencia observada en el análisis comparativo de la expresión de OX40 en la mucosa intestinal de pacientes Cel y controles consistió en una disminución en el porcentaje basal de LIEs CD3+OX40+ en los pacientes Cel Ped frente a los controles respectivos (figura 29 C).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

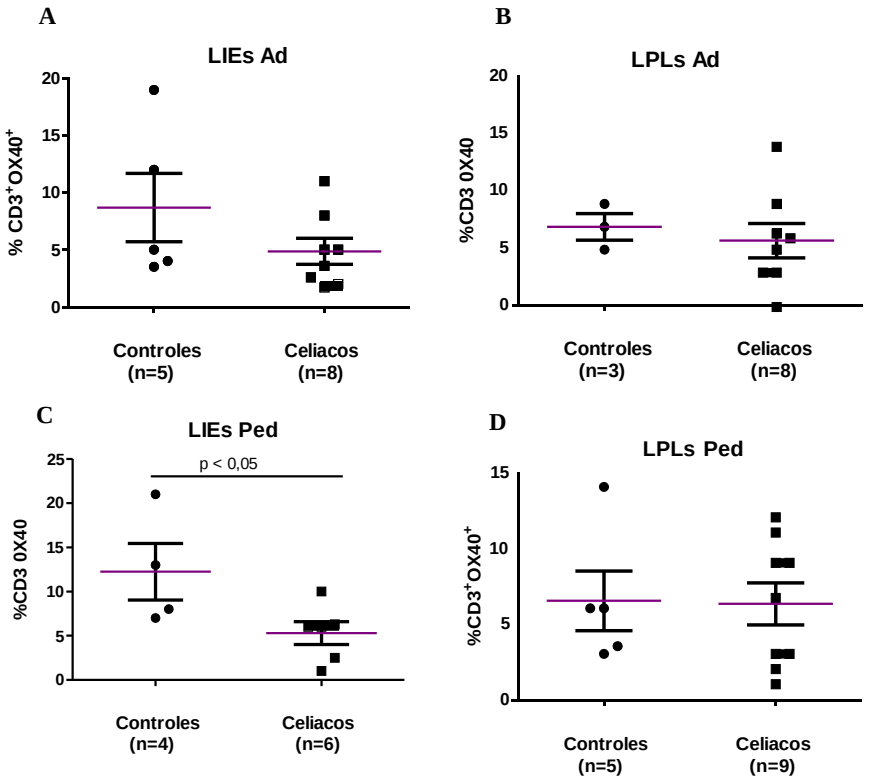


Figura 29: Análisis comparativo de la expresión de OX40 en LIEs y LPLs entre individuos control y pacientes Cel.
Porcentaje de LIEs y LPLs CD3+OX40+ en controles y pacientes Cel Ad (A y B) y Ped (C y D), respectivamente. Se indican los valores promedio ± SEM, n: número de muestras. El análisis estadístico se determinó mediante el test- t de Student´s a dos colas.

Utilizando los datos presentados en las figuras 28 y 29 para el grupo de pacientes Cel, comparamos los respectivos porcentajes de expresión de CD30 respecto a OX40 en LIEs (población adulta y pediátrica) y LPLs (población adulta y pediátrica) obteniendo los siguientes resultados, figura 30:

¾ No se observaron diferencias entre las subpoblaciones CD3+OX40+ y CD3+CD30+ ni para LIEs ni para LPLs de pacientes adultos, figura 30 A y B, respectivamente.

¾ Por el contrario, tanto para LIEs como para LPLs se observó que la subpoblación CD3+ OX40+ es mayor a la CD3+CD30+ en pacientes pediátricos, figura 30 C y D, respectivamente.

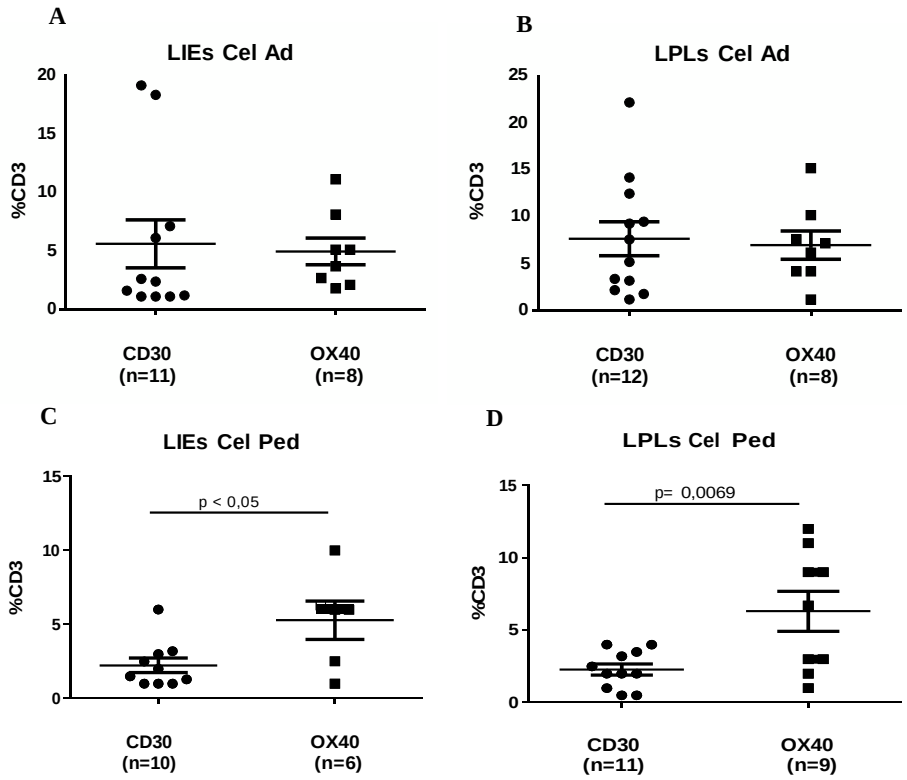


Figura 30: Estudio comparativo de las subpoblaciones CD3+CD30+ y CD3+OX40+. Se comparan los porcentaje de células CD3+CD30+ vs. CD3+OX40+ en LIEs y LPLs en pacientes Cel Ad (A y B) y Ped (C y D).
Se indican los valores promedio ± SEM; n: número de muestras. El análisis estadístico se determinó mediante el test- t de Student´s a dos colas.

En lo que respecta a los individuos control, tampoco hemos obtenido diferencias entre LIEs y LPLs (datos no mostrados).

2.2.2 Efecto de la gliadina sobre la expresión de moléculas de activación en LIEs y LPLs: CD25, CD69, CD45RO, CD30 y OX40

Las biopsias intestinales provenientes de población adulta y pediátrica (según se indica en cada caso) fueron divididas en mitades. Se procedió a cultivar una mitad de la biopsia de cada paciente en medio de cultivo conteniendo gliadina, y otra en presencia de medio de cultivo solo, como control negativo intra-ensayo (y que a su vez representa la “condición basal”) durante un período de 3h (ver Materiales y Métodos).

Los marcadores de activación CD25, CD45RO y CD69 fueron nuevamente analizados en las suspensiones de LIEs y LPLs luego de 3h de cultivo con gliadina. Los porcentajes respectivos para cada molécula, observados en presencia de gliadina, no difieren respecto a las condiciones basales (tabla C).

Debido a la disponibilidad limitada de muestras, el marcador de activación CD30

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

fue evaluado en pacientes y controles adultos, (figura 31) y sólo en pacientes Cel Ped (figura 32). Llamativamente, el agregado de gliadina provocó un aumento en la proporción de LPLs CD30+ en biopsias provenientes de pacientes Ped (figura 32 B) en las cuales se había descripto un menor porcentaje de LPLs CD30+ en condición basal (figura 28D).

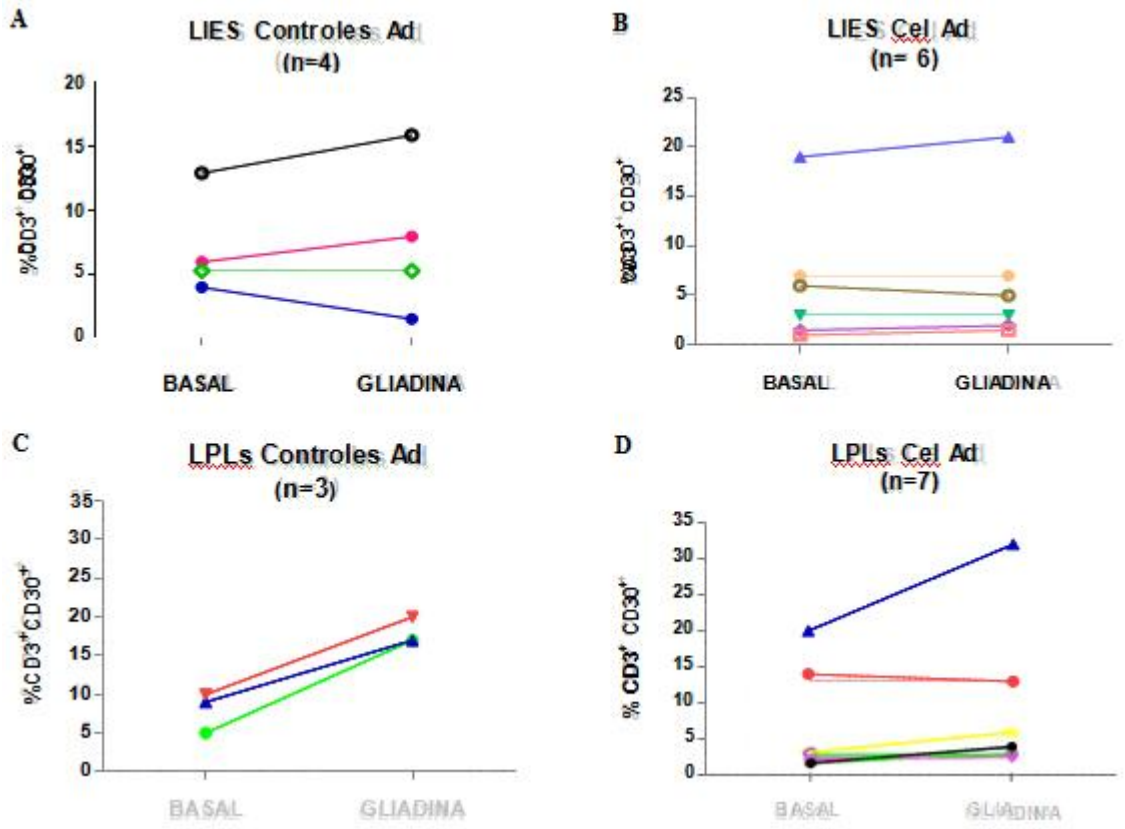


Figura 31: Modulación de la expresión de CD30 frente a estímulo con gliadina en biopsias duodenales provenientes de individuos adultos.
Se indican los porcentajes de células CD3+CD30+ en LIEs (A y B) y LPLs (C y D) antes y después de la estimulación con gliadina. Cada línea representa un resultado individual en controles Ad (A y C), y Cel Ad (B y D) respectivamente. El análisis estadístico se determinó mediante el test- t de Student´s pareado a dos colas.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

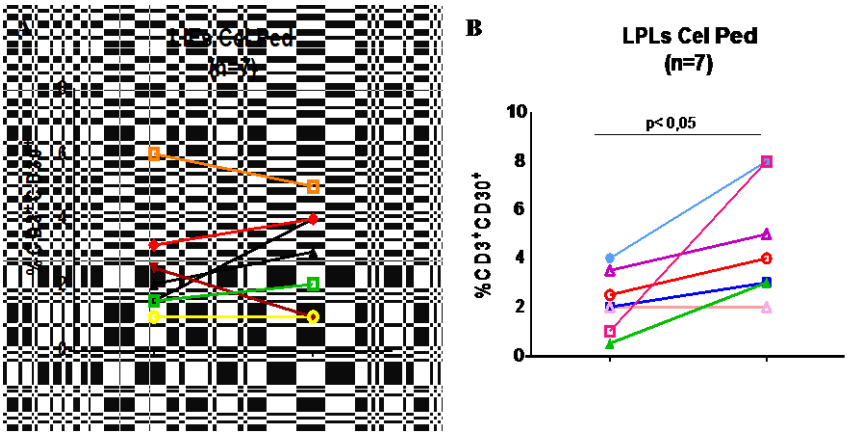


Figura 32: Modulación de la expresión de CD30 frente al estímulo con gliadina en biopsias duodenales provenientes de individuos pediátricos.
Se indican los porcentajes de LIEs (A) y LPLs (B) CD3+CD30+ obtenidos antes y después de la estimulación con gliadina. El análisis estadístico se determinó mediante el test- t pareado a dos colas

Debido a la disponibilidad limitada de muestras de Controles Ad, OX40 fue evaluado sólo en pacientes Cel Ad (figuras 33) y en Controles Ped como en Cel Ped (figura 34).

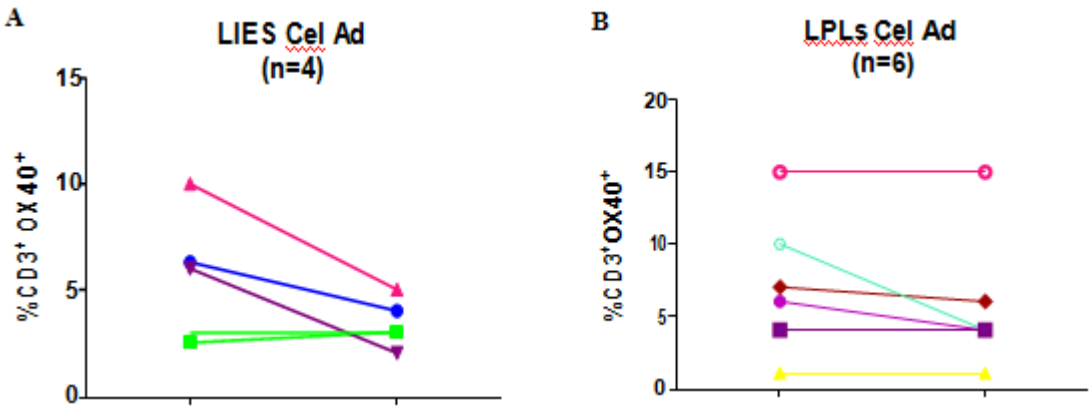


Figura 33: Modulación de la expresión de OX40 frente al estímulo con gliadina.

Se indican mediante líneas los resultados individuales correspondientes al porcentaje de células $CD3^{+}OX40^{+}$ en LIEs (A) y LPLs (B) antes y después de la estimulación con gliadina, en pacientes Cel Ad. El análisis estadístico se determinó mediante el test- t de Student`s pareado a dos colas.

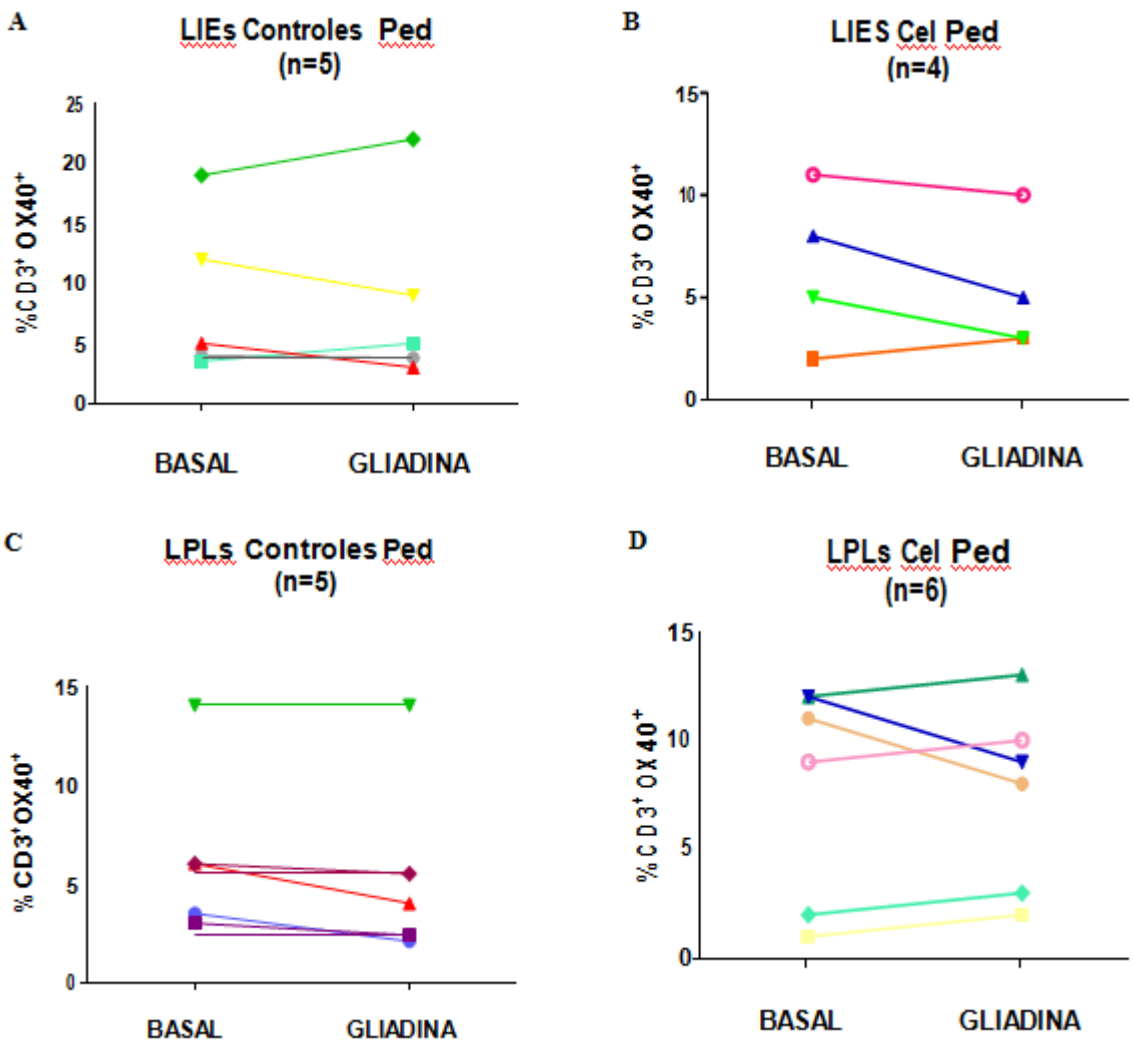


Figura 34: Modulación de la expresión de OX40 frente al estímulo con gliadina en biopsias duodenales provenientes de individuos pediátricos.

Se indican los porcentajes de $CD3^{+}CD30^{+}$ en LIEs (A y B) y LPLs (C y D) antes y después de la estimulación con gliadina. Las líneas representan resultados individuales correspondientes a individuos control (A y C), y pacientes Cel (B y D), respectivamente. El análisis estadístico se determinó mediante el test- t pareado a dos colas.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

En el caso de OX40, la única diferencia que habíamos observado en biopsias de pacientes Cel Ped en condición basal es un menor porcentaje de LIEs OX40$^+$ en comparación con las respectivas muestras control (figura 29C). Sin embargo, dichos LIEs no responden diferencialmente frente a gliadina cuando se los compara con LIEs provenientes de las respectivas muestras control (figura 34 B). No encontramos diferencias frente al estímulo con gliadina en LIEs ni en LPLs OX40$^+$ en ninguna de las dos poblaciones etarias analizadas.

2.2.3 Modulación de CD30 por IL-15 en LIEs y LPLs

El siguiente estudio fue realizado solo en población pediátrica. Para evaluar el efecto de IL-15 sobre la expresión de CD30 u OX40 en LIEs y LPLs, cada biopsia duodenal fue dividida en tres fracciones. Éstas fueron incubadas durante 3 h, en presencia de IL-15, de gliadina, o en medio de cultivo (condición basal). Al cabo de la incubación, se prepararon suspensiones celulares de LIEs y LPLs por disgregación de las biopsias como se indicó en la sección de Materiales y Métodos. Observamos un incremento en el porcentaje de LIEs CD3$^+$CD30$^+$ frente al estímulo con IL-15 en el único individuo Control Ad y en uno de los dos pacientes Cel Ad estudiados, figura 35A. A su vez, se observó un incremento en el porcentaje de LPLs CD3$^+$CD30$^+$ frente al estímulo de IL-15 en muestras de dos pacientes y ambos controles, figura 35B. Debido al escaso número de biopsias disponibles para este estudio, sólo se presenta un análisis individual de resultados sin el correspondiente análisis estadístico.

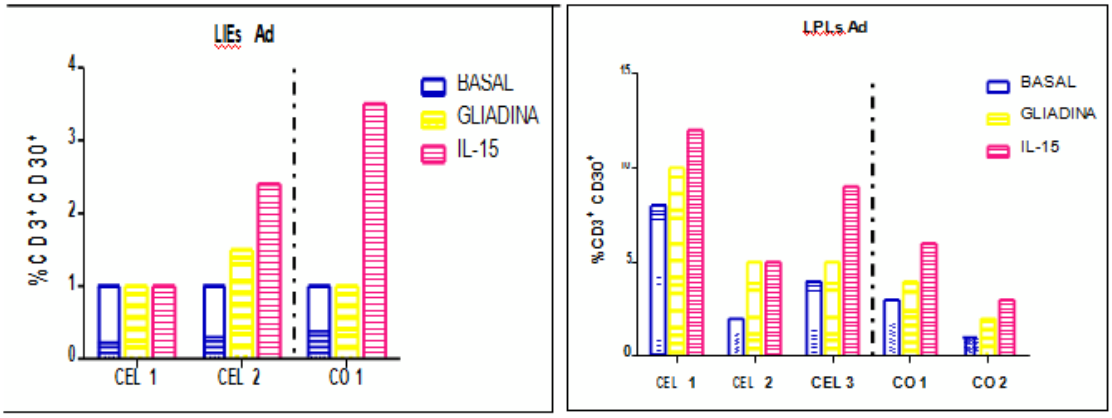


Figura 35: Efecto de gliadina e IL-15 sobre la expresión de CD30 en LIEs y LPLs de Cel Ad y Contro Ad. Porcentajes de CD3$^+$CD30$^+$ en LIEs (A) y LPLs (B), luego de la estimulación con gliadina o con IL-15. Las barras representan valores individuales.

Resumen de Resultados

¾ La distribución de LIEs y LPLs CD30+ es idéntica en biopsias duodenales de pacientes y controles, con predominio en la LP.

¾ En la población adulta, ni LIEs ni LPLs de controles o Cel difieren en la expresión de CD30 y OX40. Por otro lado, los porcentajes de dichas poblaciones tampoco se modifican por el agregado de gliadina.

¾ En la población pediátrica, encontramos algunas diferencias entre los pacientes Cel y controles. El porcentaje de LPLs CD30+ basal es menor en pacientes Cel y la gliadina induce un incremento en esta supoblación celular. La subpoblación basal de LIEs OX40+ es menor en Cel respecto a controles pero la gliadina no modifica su porcentaje de expresión.

¾ Al comparar la expresión basal de CD30 y OX40 en cada subpoblación linfocitaria, observamos un mayor porcentaje de OX40 que de CD30 tanto en LIEs como en LPLs de pacientes Cel Ped pero no adultos ni controles.

¾ El estímulo con IL-15 no indujo incrementos en la expresión de CD30 ni OX40 en LIEs ni en LPLs.

Discusión de resultados

El análisis de CF nos ha permitido caracterizar fenotípicamente las distintas subpoblaciones linfocitarias de LIEs y LPLs presentes en la mucosa del ID en pacientes con EC, en cuanto a la expresión de diferentes moléculas de activación celular. Así, hemos observado que ni los porcentajes de LIEs ni los de LPLs CD69+ y CD45RO+ difieren entre los pacientes Cel y controles. La expresión de CD45RO mayor al 90% refleja el fenotipo de memoria característico de las poblaciones linfocitarias presentes en el ID. Nuestros resultados concuerdan con trabajos previos que habían demostrado la presencia de un pequeño porcentaje de LIEs CD3+CD25+ (Eiras P y col. , 1998; Sillett HK y col. , 1999). A diferencia de otros autores (Halstensen TS y Brandtzaeg, P 1993) que observaron mayores porcentajes de LPLs CD25+ en pacientes Cel que en controles, nosotros no encontramos diferencias (no sólo en LPLs sino tampoco en LIEs) entre individuos control y

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

pacientes. Se ha reportado además, que el desafío con gliadina en biopsias provenientes de pacientes celíacos en DLG, se caracterizó por un aumento en la expresión de CD25 (Salvati VM y col. , 2005). Al no disponer de biopsias de pacientes en DLG, debido a que ante su buena evolución clínica de los pacientes no es aconsejado el control mediante biopsia duodenal (Walter-Smith JA y col. , 1990), en nuestros experimentos el desafío con gliadina fue realizado en todos los casos con material proveniente de pacientes celíacos activos. Bajo estas condiciones, la gliadina no disparó expresión de CD25 ni en LIEs ni en LPLs. Si bien sólo podemos especular acerca de las diferencias entre nuestros resultados y los de los autores citados (para la expresión de CD25), se deben tener en cuenta algunas consideraciones:

En primer lugar dichas diferencias pueden deberse al uso de diferentes metodologías. Tanto el trabajo de Halstensen como el de Salvati utilizaron una técnica de análisis cualitativo (inmunohistoquímica); la CF, en cambio, arroja datos cuantitativos. En segundo lugar, las diferencias pueden atribuirse a la duración del estímulo ex-vivo con gliadina. Si bien no contamos con jarras anaeróbicas requeridas para realizar cultivos prolongados, la evidencia de que la gliadina induce cambios tempranos en la expresión de diversos marcadores intestinales (Maiuri y col. , 1996; Maiuri y col. , 2003) nos impulsó a realizar la estimulación durante 3h. En tercer lugar a que nuestros pacientes no se encontraban en DLG, y probablemente esta condición haya determinado una menor posibilidad de evidenciar respuestas tempranas (3h) o de baja magnitud.

En cuanto a la expresión de CD30 hemos descripto diferencias entre la población pediátrica y adulta. En los pacientes adultos, no encontramos diferencias ni en cuanto a su expresión basal ni en cuanto a la respuesta a gliadina en LIEs o LPLs. En niños, en cambio, observamos un menor porcentaje de LPLs CD30+ en los pacientes con respecto a los controles en condición basal. Sorprendentemente, el incremento en el porcentaje de LPLs CD30+ luego de la estimulación con gliadina fue mayor en los pacientes celíacos que en controles.

Como se ha comentado en la introducción los péptidos de gliadina inducen producción de IL-15 en la mucosa intestinal de pacientes celíacos y dicha citoquina desencadena efectos muy diversos (Maiuri L y col. , 2000). Si bien no hemos podido evaluar la producción de IL-15 en nuestros sobrenadantes de cultivo de biopsias estimuladas con gliadina, podemos inferir que su producción se induce luego de 3 h de estímulo, como fue previamente demostrado por Bernardo D y col. , 2007. Sumado a estos efectos, la mucosa intestinal de los pacientes celíacos pediátricos expresa altos niveles basales de IL-10 derivada de LT en comparación con pacientes celíacos en DLG y controles (Forsberg G y col. , 2002; Salvati VM y col. , 2005) y además, habiéndose demostrado que IL-10 inhibe el desarrollo de las células T CD30+ y con ello la producción de INF-γ (Alzona M y col. , 1995), proponemos que la expresión basal de CD30

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

en LPLs, observada en los pacientes pediátricos, se mantendría en un bajo nivel de expresión debido a la sobreproducción de IL-10 y que el aumento en el porcentaje de LTCD3+CD30+, producido luego de la estimulación antigénica, podría estar dado por la síntesis de IL-15 que induciría un desbalance a favor de la expresión de CD30. En este escenario, debe asumirse que la cantidad IL-10 en las biopsias sería insuficiente como para contrarrestar la respuesta inmune mediada por citoquinas principalmente de perfil Th1 desencadenadas en respuesta a gliadina.

A fin de intentar una interpretación acerca del origen probable de las células identificadas en biopsias intestinales provenientes de pacientes y controles a nivel basal, podemos considerar dos alternativas no excluyentes. La primera consiste en que en los sitios inflamados (como la mucosa intestinal del paciente celíaco), IL-15 actuaría como quimioatractante de LT, una función mediada por la "activación" de los endotelios a través de la inducción de moléculas de adhesión (LFA-1/ICAM-1) (Wilkinson PC y Liew FY 1995, Sancho D y col. , 1999). En particular, IL-15 facilitaría el reclutamiento de LT CD45R0+ periféricos (McInnes IB y col. , 1996), algunos de los cuales, como vimos, expresan CD30 u OX40.

La segunda alternativa se basa en que los LT expresan un ARNm específico para CD30 a pesar de ser LTCD30-. Este transcripto es capaz de traducirse, y la proteína ser expuesta en superficie luego del contacto del LT con endotelios activados (Gerli R. y col. , 2000; Gerli, R y col. , 2001). Los LTCD30- podrían entonces ingresar desde la periferia a la mucosa y expresar CD30 como consecuencia de la presencia de antígenos y factores coestimulatorios locales (Gilfillan MC y col 1998; Iannone F y col. , 1994).

El estudio de una posible expresión de CD30L en células endoteliales del ID permitiría dilucidar la participación de CD30 en la migración desde la periferia hacia la mucosa intestinal.

En lo que respecta a OX40, ha sido reportada la presencia de LPLs CD4+OX40+ en pacientes Cel, y no en individuos control (Stüeber E y col. , 2000). Sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados, observamos que existen similares porcentajes de LPLs OX40+ tanto en pacientes como en controles de poblaciones adulta y pediátrica.

Como se comentó en la Introducción, la supervivencia de los LTCD4+ dentro de la LP de la mucosa intestinal requiere señales mediadas por CD30 y OX40. De acuerdo con ésto, nuestros resultados indican que la expresión de OX40 también sería necesaria en los LT de la mucosa intestinal normal. Si bien no hay estudios en humanos, el sistema OX40/OX40-L en LIEs de ratón (Wang HC y Klein JR, 2001) tendría un papel central en el mantenimiento de la homeostasis local. En ese modelo, OX40 identificaría una subpoblación de LIEs efectores recientemente activados por antígeno, capaces de producir INF-γ y suprimir la expresión de IL-10. En nuestros experimentos observamos una disminución en el porcentaje de LIEs OX40+ sólo en pacientes celíacos pediátricos

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

respecto a las biopsias control. Una extrapolación del modelo murino al humano nos permite señalar, que esta disminución en el porcentaje de LIEs OX40+ en los pacientes celíacos pediátricos, es al menos coincidente con el incremento de IL-10 reportado previamente en la literatura (Forsberg y col. , 2002; Salvati V y col. , 2005).

Los LIEs constituyen una población celular parcialmente activada como lo denota la expresión de CD69 o su actividad citotóxica espontánea. Para adquirir un mayor grado de activación requieren señalización a través del receptor antigénico. El hecho de que la estimulación con gliadina no haya modificado la expresión de OX40 en LIEs (ni en LPLs) implica -en principio- que OX40 no estaría involucrada dentro de los efectos disparados por la gliadina en el ID. Se plantea así una aparente discordancia entre los resultados observados en condiciones basales (disminución del porcentaje de LIEs OX40+ en celíacos pediátricos vs. controles) y los observados luego del estímulo con gliadina (similares porcentajes de LIEs OX40+ antes y después del estímulo tanto en pacientes como en controles). Entre las posibles causas de dicha discordancia mencionamos la insuficiencia del estímulo antigénico en duración y/o concentración y/o la utilización en todos los casos de muestras provenientes de pacientes celíacos activos.

Por último, los mayores porcentajes de LIEs y LPLs OX40+ observados en condición basal con respecto a LIEs y LPLs CD30+ en biopsias de pacientes celíacos pediátricos, pero no de adultos, nos permite inferir la existencia de diferentes señales que regulan la expresión de ambas moléculas en los LT, y que las mismas difieren entre ambos grupos etarios.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

3- ECR: Parámetros clínicos, moleculares y celulares asociados con el pronóstico y su evolución

3.1 Estudio molecular de TCR-γ y su relación con el inmunofenotipo

Pudieron ser estudiados los reordenamientos del TCR-γ en 34 pacientes de un total de 37, que nos posibilitaron inferir la expansión local de uno/pocos clones de LT predominantes. Observamos rearreglos monoclonales en 18/34 pacientes (53%) y rearreglos policlonales en 16/34 pacientes (47%).

Por otro lado, se estudió el inmunofenotipo de los LIEs mediante técnicas de imnunohistoquímica. De los 17 pacientes con LIEs de fenotipo aberrante, 11 presentaron un patrón de TCR-γ monoclonal (65%). Se observó una concordancia de 78% entre fenotipo aberrante y monoclonalidad (11/14), y un 54% entre fenotipo aberrante y policlonalidad (6/11), tabla D.

Paciente	Sexo/Edad	TCR-γ	Inmunofenotipo LIEs
1	F/29	M	A
2	F/50	M	ND
3	F/46	M	ND
4	M/31	M	ND
5	F/58	M	A
6	F/38	M	A
7	F/53	M	A
8	F/54	M	ND
9	M/45	M	A
10	F/63	M	A
11	M/50	M	A
12	M/39	M	A
13	M/53	M	A
14	M/33	M	N
15	F/25	M	N
16	M/46	M	N
17	F/43	M	A
18	F/55	M	A
19	F/54	P	N
20	M/44	P	A
21	F/41	P	N
22	M/52	P	N
23	F/54	P	A
24	M/60	P	A
25	F/53	P	A
26	F/43	P	ND
27	F/53	P	ND
28	M/50	P	ND
29	M/61	P	N
30	F/57	P	A
31	F/45	P	A
32	F/37	P	N
33	F/47	P	ND
34	F/51	P	ND
35	F/46	ND	ND
36	M/39	ND	ND
37	M/52	ND	ND

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Tabla D: Estudio de clonalidad de TCR-γ e inmunofenotipo de los LIEs.

Los pacientes refractarios se categorizan en base al análisis de TCR- γ, M: Monoclonal, P: Policlonal y al inmunofenotipo de los LIEs. (A): Aberrante, (N): Normal, ND: no determinado.

3.2 Evolución de la ECR: Tasa de sobrevida y causas de muerte

La tabla E indica el tiempo de evolución de la EC (considerado entre el diagnóstico inicial de EC y el posterior diagnóstico de ECR), los pacientes restantes debutaron con ECR. También se indica la presencia de yeyunitis ulcerativa (YU) (59 % de los pacientes), el tiempo de evolución de la ECR (considerado entre su diagnóstico y la actualidad), las causas de defunción y el estado actual de los pacientes que permanecen vivos.

Paciente	Diagnóstico entre EC y ECR	Tiempo de Evolución desde ECR	YU	Causa de defunción	Estado Actual
1	1 m	ND	SÍ	ND	Bueno
2	2 m	1m	SÍ	EATL	ND
3	debuta ECR	2a 7m	SÍ	Sepsis	ND
4	2 m	ND	SÍ	ND	Bueno
5	3a	1a	SÍ	Isquemia intestinal	ND
6	1a	ND	SÍ	ND	Bueno
7	debuta ECR	1a	SÍ	Sepsis- Neumonía	ND
8	2a 6m	1a 7m	SÍ	Infarto	ND
9	1a 3m	ND	ND	ND	Diarrea
10	5 m	2a 1m	ND	Tromboembolismo pulmonar	ND
11	7a 4m	ND	ND	ND	Diarrea
12	4m	2a 2m	ND	ND	Bueno
13	debuta ECR	ND	ND	ND	Bueno
14	1m	ND	ND	Sepsis	ND
15	1a 7m	ND	ND	ND	Bueno
16	9a	ND	SÍ	ND	Bueno
17	1 m	ND	SÍ	ND	Bueno
18	1a	ND	ND	ND	Bueno
19	23a	ND	SÍ	ND	Bueno
20	1m	3a 9m	SÍ	Sepsis	ND
21	10a	ND	SÍ	ND	Bueno
22	9 m	1a 1m	SÍ	EATL	ND
23	5a 6m	10m	SÍ	EATL	ND
24	3m	ND	SÍ	ND	Bueno
25	4m	ND	SÍ	ND	Bueno
26	ND	ND	ND	Sepsis	ND
27	ND	ND	ND	Deterioro progresivo	ND
28	ND	ND	ND	ND	Bueno
29	2a 6m	ND	ND	ND	Bueno
30	12a	15a 5m	ND	Sepsis	ND
31	5 m	ND	SÍ	ND	Bueno
32	debuta ECR	ND	SÍ	ND	Regular
33	debuta ECR	ND	ND	ND	Bueno
34	ND	ND	ND	ND	Bueno
35	ND	ND	SÍ	EATL	ND
36	ND	ND	SÍ	EATL	ND
37	ND	ND	SÍ	EATL	ND

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Tabla E: Progresión de la ECR.

Se detallan las causas de defunción y el estado actual de salud de los pacientes refractarios que se encuentran con vida. EATL: Linfoma T asociado a Enteropatía. a: años, m: meses.

El tiempo promedio de evolución de la ECR en 10/16 fallecidos fue de 2 años y 10 meses. En aquellos pacientes que presentaron monoclonalidad el tiempo promedio fue de sólo 1 años y 5 meses, mientras que en pacientes que presentaron expansión policlonal, el promedio de sobrevida fue mucho mayor, 5 años y tres meses.

En cuanto a la mortalidad global, se registró un 43% (16/37 pacientes), 7 de los cuales pacientes presentaron monoclonalidad (44%), 6 presentaron policlonalidad (37%) y 3 no pudieron ser determinados. Las causas de la mortalidad se asociaron a:

EATL en seis pacientes de los cuales solo 1 presentó un patrón monoclonal (paciente 2) e inmunofenotipo no determinado. Dos presentaron un patrón policlonal (paciente 22 y 23) donde solo el paciente 23 presentó LIEs aberrantes. Por último, en los tres pacientes restantes no fue posible evaluar su inmunfenotipo.

La mortalidad en los casos donde no hubo desarrollo de EATL se debió a falla vascular (n=3), sepsis en el marco de deterioro progresivo sin desarrollo de malignidad (n=6) y desnutrición progresiva (n=1).

Los 17 pacientes que se encuentran con vida son asintomáticos, presentan diarreas persistentes (n=2) o bajo peso (n=2).

3.3 Expresión de IL-15, IL-18 e INF-γ en biopsias duodenales

Se evaluaron por RT-PCR semi-cuantitativa los niveles basales de transcriptos para las citoquinas IL-15, IL-18 e INF-γ en biopsias duodenales provenientes de pacientes refractarios libres de tratamiento farmacológico.

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio, demostramos un incremento en la expresión de IL-15 e INF-γ, pero no de IL-18 en pacientes Cel Ad vs. controles (datos no mostrados). Utilizando el mismo grupo de pacientes celíacos (n=10) comparamos el nivel de expresión de estas citoquinas con un grupo de los pacientes refractarios (n=5), correspondientes a los pacientes: 2, 3, 6, 12 y 20. Los resultados se detallan en la figura 36.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

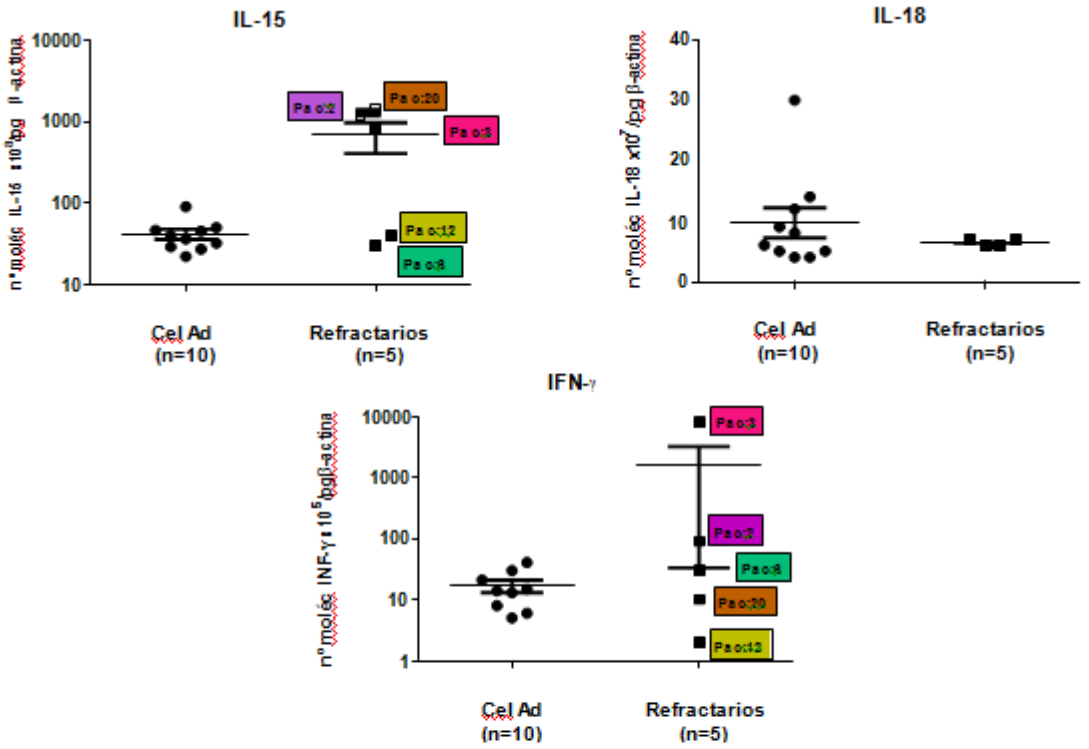


Figura 36: Determinación de transcriptos para IL-15, IL-18 e INF-γ mediante RT-PCR semi-cuantitativa.

Las barras horizontales indican el número promedio normalizado de transcriptos ± SEM. n= número de muestras. El análisis estadístico se determinó mediante el test- t de Student´s a dos colas.

Observamos heterogeneidad en el número de transcriptos de IL-15 e INF-γ en los pacientes refractarios, con cierta tendencia hacia un mayor nivel de transcripción basal. En el caso de los transcriptos de IL-18, observamos homogeneidad en los resultados aunque sin diferencias con respecto a Cel. Estos aumentos fueron estadísticamente significativos cuando se compararon refractarios con el grupo control, como lo era también el grupo de los pacientes celíacos vs. controles (datos no mostrados).

El análisis de TCR-γ para estos 5 pacientes refractarios determinó monoclonalidad en 4 pacientes (2, 3, 6 y 12) y policlonalidad en 1 (20) (tabla F). En la figura 37 se puede observar la presencia / ausencia de amplificación de un fragmento de aproximadamente 200 pb (banda monoclonal) según se indica.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

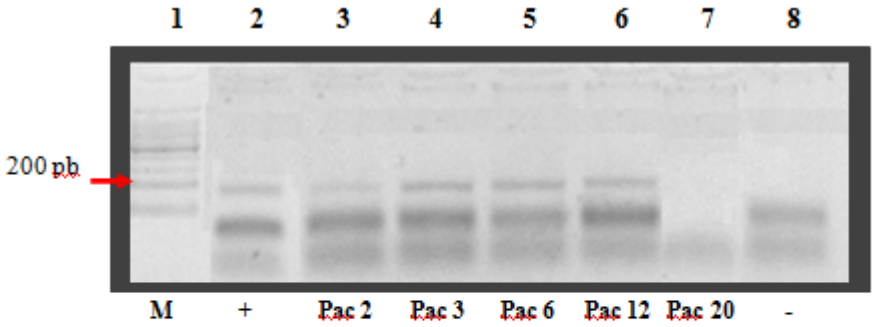


Figura 37: Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos amplificados mediante el análisis de clonalidad en biopsias duodenales de pacientes con ECR. Calle 1: marcador de peso molecular, calle 3 - 6 pacientes (Pac) con amplificación monoclonal, calle 7: P 20 con patrón de amplificación policlonal (ausencia de banda de amplificación). (+): control positivo (células MOLT-4). (-): control negativo.

La tabla F reúne las características de los pacientes sometidos a análisis de expresión de citoquinas, el nivel de clonalidad, inmunofenotipo de los LIEs y las causas de defunción.

Paciente	IL-15	INF-γ	TCR- γ	Inmunofenotipo LIEs	Causa de defunción
2	+ + +	+	M	ND	EATL
3	+	+ + +	M	ND	Sepsis
6	+	+	M	A	ND
12	+	+	M	A	ND
20	+ + +	+	P	A	Sepsis

Tabla F: Características de los pacientes refractarios disponibles para el estudio de expresión de citoquinas.

IL-15: (+): n°transcriptos / pg β-actina < 1.10^{10}; (++): 1.10^{10} < n° transcriptos / pg β-actina < $1,1.10^{11}$; (+++): n° transcriptos / pg β-actina > 1.10^{11}.

INF- γ: (+): n° transcriptos / pg β-actina < 1.10^{6}; (++): 1.10^{6} < n° transcriptos / pg β-actina < 1.10^{8}; (+++): n° transcriptos / pg β-actina > 1.10^{8}

M: Monoclonal. P: Policlonal. A: Aberrante. ND: No determinado

Podemos destacar que el paciente que desarrolló EATL expresó altos niveles de IL-15 e INF-γ. Por otro lado, los dos pacientes que presentaron los niveles más bajos de IL-15, en asociación con monoclonalidad y presencia de LIEs aberrantes (Pac 6 y 12) continúan con vida y en buen estado de salud. Esto sugeriría que aún expresada, la IL-15 podría ser localmente contrabalanceada por diferentes citoquinas o factores locales que podrían prevenir el curso más severo de la enfermedad.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

3.4 Análisis de la expresión de CD30 en LIEs y LPLs en respuesta a IL-15

Se evaluó la expresión y la modulación de CD30 por IL-15 en LIEs y LPLs provenientes de biopsias duodenales cultivadas durante 3h en presencia de IL-15, figura 38.

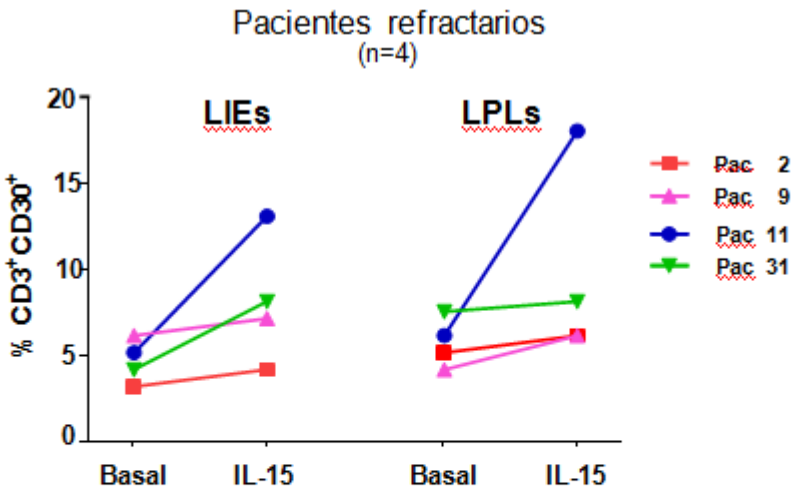


Figura 38: Modulación de la expresión de CD30 por IL-15 en biopsias duodenales provenientes de pacientes refractarios.

Se indican los porcentajes de LIEs (izq) y LPLs (der) $CD3^{+}CD30^{+}$ en condición basal y frente a estímulo con IL-15 por 3 h. Las líneas representan resultados individuales de cada paciente con ECR.

n: número de pacientes.

Los resultados obtenidos demostraron un incremento en la expresión de CD30 tanto en LIEs como en LPLs, luego del agregado de IL-15 en los cuatro pacientes analizados. No pudo realizarse el estudio estadístico por el escaso número de pacientes evaluados.

La tabla G reúne los resultados obtenidos en los mismos cuatro pacientes en cuanto a los índices de estimulación para la expresión de CD30, la presencia de YU, nivel de clonalidad, inmunofenotipo de LIEs y causas de defunción.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Paciente	YU	TCR- γ	Inmunofenotipo LIEs	Causa de defunción	Incremento de CD30 por IL-15 LIES	LPLS
2	SÍ	M	ND	EATL	-	-
9	-	M	A	ND	-	-
11	-	M	A	ND	-	-
31	SÍ	P	A	ND	-	-

Tabla G: Características de los pacientes refractarios utilizados para el estudio de la expresión de CD30. Se estableció un índice de estimulación (IE) según los niveles de expresión de la molécula CD30 antes y luego del agregado de IL-15 de la siguiente manera:

LIEs: (+): 1,0 < IE < 1,5; ++: IE > 1,5

LPLs: (+): 1,0 < IE < 1,5; (++): IE > 1,5

ND: No determinado; M:Monoclonal, P: Policlonal, A: Aberrante, N:Normal

En el pequeño grupo de pacientes ECR disponible para el análisis de expresión de CD30, al igual que para el pequeño grupo disponible para la evaluación de citoquinas, resulta difícil concluir si existe correlación entre la regulación de la expresión de CD30 por IL-15 y demás parámetros especificados en la tabla G. El paciente 11, en que se registró un mayor incremento en la expresión de CD30 en LIEs y LPLs no evidencia EATL y la respuesta a IL-15 fue moderada, pero vale aclarar que este paciente continúa con diarrea persistente (Tabla E), con lo cual es esencial su seguimiento médico.

3.5 EATL en pacientes con ECR

El 16 % (6/37) de los pacientes refractarios desarrollaron EATL y todos ellos presentaron YU. La tabla H reúne los parámetros evaluados en estos pacientes.

Paciente	TCR-γ	Inmunofenotipo LIEs	Causa de defunción	IL-15	CD30	Evolución desde ECR
2	M	ND	EATL	- - -	-	1m
22	P	N	EATL	ND	ND	1a 1m
23	P	A	EATL	ND	ND	10 m
35	ND	ND	EATL	ND	ND	ND
36	ND	ND	EATL	ND	ND	ND
37	ND	ND	EATL	ND	ND	ND

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Tabla H: Características de los pacientes refractarios que desarrollaron EATL.
ND: No determinado; M: Monoclonal, P: Policlonal, A: Aberrante, N: Normal. EATL: Linfoma T asociado a Enteropatía. a: años, m: meses.

Aunque hemos podido analizar muy pocos parámetros en estos pacientes, vale la pena destacar que el único paciente (número 2) presentó monoclonalidad, tuvo alta expresión de IL-15 (Tabla F), registró un índice de expresión de CD30 bajo en LIEs y LPLs (Tabla G) y el periodo de sobrevida posterior al diagnóstico de ECR fue solo de 1 mes. El análisis de este conjunto de parámetros en un mayor número de pacientes podría, en un futuro, tener utilidad para el pronóstico y/o seguimiento de la ECR.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Resumen de Resultados

¾ Nuestro estudio comprendió 37 pacientes con ECR de los cuales el 60% presentaron complicaciones por YU, siendo la misma una condición latente de malignidad.

¾ Encontramos un porcentaje similar de biopsias con infiltrado monoclonal y policlonal (53% y 47%, respectivamente), de acuerdo con el análisis de TCR-γ.

¾ El inmunofenotipo aberrante en los LIEs coincidió con la presencia de monoclonalidad en un 78% de los pacientes y con la presencia de policlonalidad en un 54%.

¾ Se registró una mortalidad global de un 43% independientemente de la presencia de mono o policlonalidad.

¾ El porcentaje de complicaciones y defunción por EATL fue de 16 %.

¾ La expresión de IL-15, IL-18 e INF-γ no difiere respecto del grupo de pacientes celíacos.

¾ La expresión de CD30 en LIEs y en LPLs incrementa luego de la incorporación de IL-15 a cultivos de biopsias ex vivo. Sin embargo sólo uno de los cuatro pacientes que fueron evaluados en este estudio, desarrolló EATL registrando moderados niveles de expresión de la molécula CD30.

¾ No pudimos relacionar los estudios de clonalidad, expresión de citoquinas, inmunofenotipo de LIEs y expresión de CD30 con la progresión a EATL.

Discusión de resultados

Hemos reportado el estudio de 37 pacientes diagnosticados en la misma institución. Este hecho debe destacarse ya que determinó que la selección de pacientes que presentan ECR, una entidad clínica relativamente poco estudiada hasta el momento, haya sido efectuada por el mismo equipo médico y bajo los mismos criterios de diagnóstico.

Todos estos pacientes fueron exhaustivamente investigados en función de excluir la presencia de linfomas al mismo tiempo que se realizaba el diagnostico de la ECR. Así también resulta de importancia para nuestra categorización de los pacientes su debut con la EC clásica, basado en estudios de anatomía patológica y diversos parámetros

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

clínico/serológicos (respuesta a la DLG, historia familiar de EC, presencia de anticuerpos específicos y HLA).

De acuerdo con los análisis de TCR-γ obtuvimos un porcentaje similar de biopsias con patrón monoclonal (53%) y policlonal (47%). Esta similitud contrasta con un estudio previo (Cellier y col, 2000), donde se reportó una correlación mayor al 75% entre ECR y monoclonalidad. Una explicación posible para comprender esta discrepancia es que la misma pueda estar relacionada al hecho de haber observado una presentación más frecuente de ECR tipo I en nuestra población con respecto a estudios previos. Hemos observado una alta correlación (65%) entre presencia de inmunofenotipo aberrante en LIEs y monoclonalidad, mientras que sólo fue del 35% para la presencia de inmunnofenotipo aberrante en LIEs y policlonalidad. Estos resultados coinciden con trabajos previos (Cellier y col, 1998; Verkarre V y col, 2003).

Entre las características observadas en los pacientes refractarios destacamos la alta frecuencia de YU así como de rearreglos monoclonales en su TCR-γ, en contraste con reportes previos que relacionan la YU con ECR tipo II (Cellier y col, 2003; Unidad Europea de gastroenterología, 2001), nuestro grupo de pacientes presentaron YU asociada con ambos tipos de refractariedad. Por otro lado la mortalidad fue similar entre los pacientes con ECR tipo I y tipo II.

En analogía con reportes bibliográficos (Mulder CJ y col, 2000; Isaacson PG, 2000), el tiempo de sobrevida desde el diagnóstico de la ECR en los pacientes fallecidos con ECR II, fue menor que el registrado para los pacientes con ECR tipo I.

El 16% de nuestra población de pacientes desarrolló EATL, y de los 3 individuos evaluados, uno presentó ECR tipo II, y dos presentaron ECR tipo I. A pesar de que la ECR tipo II se ha asociado con el desarrollo de EATL (Al- Toma y col, 2007), y es considerada como un estadío previo a la lesión de EATL tipo I (van de Water y col, 2010), nuestros resultados no indicaron tal correlación probablemente debido al escaso número de pacientes que desarrollaron EATL. Sin embargo vale destacar un interesante trabajo (Verbeek y col, 2008), en el que demuestra que el estudio inmunofenotípico de LIEs por CF tiene mayor valor predictivo para el desarrollo de EATL y mayor sensibilidad respecto al estudio de clonalidad de dichas células presente en las biopsias. En consecuencia, la posibilidad de adoptar este tipo de estudio, junto con los actualmente utilizados (clonalidad e inmunohistoquímica), permitiría distinguir con más exactitud no sólo el tipo de ECR sino el pronóstico respecto del desarrollo de EATL.

Por otro lado, y como se ha comentado en la Introducción. la producción de IL-15 favorece la activación de los LIEs, promueve su proliferación clonal por lo que favorecería el desarrollo de EATL. Sin embargo, nosotros no pudimos correlacionar la producción de IL-15 con el desarrollo de EATL probablemente también debido al escaso número de pacientes disponibles. Contrariamente a reportes que evidencian una sobreexpresión de

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

IL-15 en la mucosa intestinal de pacientes refractarios que perpetúa el daño epitelial y promueve la proliferación de clones T (Mention JJ y col, 2003) nosotros observamos similar nivel de expresión de IL-15 en EC y ECR. Esta diferencia podría deberse no sólo al tamaño de nuestra muestra sino a la metodología utilizada, hoy prácticamente desplazada por el uso de la PCR en tiempo real.

Al evaluar el efecto de IL-15 sobre la expresión de CD30 en LIEs y LPLs, observamos un incremento en su expresión en los cuatro pacientes evaluados. En concordancia con los resultados relativos a los efectos de IL-15 sobre CD30 presentados en esta tesis (y recientemente publicados (Periolo y col, 2010), sería probable que el efecto local de IL-15 fuese amplificado en la mucosa intestinal de pacientes con ECR a diferencia de pacientes con EC. En estos últimos pacientes, mecanismos regulatorios aún no completamente dilucidados podrían contrarrestar la producción de IL-15, tal como se discutió en los capítulos previos.

Aunque no podemos concluir que el aumento de CD30 coincide con el desarrollo de EATL en nuestros pacientes, ya que el paciente que desarrolló EATL no fue el paciente que registró mayor expresión de CD30, podemos sugerir sin embargo, que la expresión de CD30 indicaría un peor pronóstico para la ECR basado no sólo en la posibilidad de desarrollar EATL concomitantemente con la presencia de CD30, como sugiere el trabajo de (Farstad y col, 2002) sino también en las características funcionales descriptas para las células CD30+ en cuanto su modulación positiva por IL-15 y producción de INF-γ, tal como se demostró en la presente tesis.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en la presente Tesis nos han permitido identificar novedosas diferencias en cuanto a la expresión y modulación de moléculas coestimulatorias de la familia de TNF-R (CD30, OX40) y demás moléculas de activación celular. Cabe destacar que muy pocos estudios han realizado comparaciones acerca de los mecanismos inmunológicos involucrados en la patología celíaca de niños y adultos. No sólo hemos encontrado diferencias entre pacientes celíacos y controles, sino también entre pacientes pediátricos y adultos; lo cual nos permite inferir la existencia de diferentes mecanismos inmunopatogénicos entre los dos grupos etarios.

Si bien el intestino delgado es el principal órgano afectado, la enfermedad posee importantes manifestaciones a nivel sistémico, y son también escasos los estudios tendientes a identificar la probable correlación entre los compartimientos local y periférico. Esto nos motivó a indagar acerca de la identificación de nuevos marcadores inmunológicos en periferia que podrían ser extrapolados al compartimiento local.

A continuación se destacan las principales conclusiones derivadas de este estudio:

1- En pacientes celíacos pudimos identificar mayor porcentaje de blastos T CD30+ en el compartimiento periférico tanto en células de memoria (CD45RO+) como activadas (CD25+). Estos blastos T se caracterizan por persistir luego de la estimulación mitogénica, ser modulados positivamente por IL-15 y ser en su mayor parte productores de INF-γ respecto de IL-4.

   La modulación positiva por gliadina en la subpoblación celular de LPLs (CD3+CD30+) en pacientes celíacos pediátricos, proveería a estas células una capacidad adicional de respuesta ante estímulos regulatorios, como así también, estaría asociada con el desarrollo de la respuesta inflamatoria predominantemente Th1 demostrada en el contexto de esta patología.

2- Identificamos, por otro lado, que la subpoblación de blastos T CD3+OX40+ en periferia también se encuentra presente en células de memoria y en células activadas. Esta subpoblación, en cambio, disminuye frente a IL-15 preferentemente en pacientes celíacos adultos. La misma población se caracteriza por ser productora tanto de INF-γ como de IL-4 en igual magnitud.

   En el compartimiento local, por otro lado, observamos una disminución en el porcentaje de células CD3+OX40+ en condición basal (en LIEs de pacientes pediátricos vs. controles) sin verse modificada dicha subpoblación frente al estímulo con gliadina. En primera instancia, ésto implica que la modulación de OX40 no estaría influenciada directamente por gliadina. Sin embargo, dado que los blastos T CD3+OX40+ periféricos son modulados negativamente por IL-15,

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

nos encontramos ante una interesante diferencia regulatoria que merece ser evaluada en función de la participación de OX40 en el desarrollo y homeostasis de las células T regulatorias.

3- Por último, en los pacientes con ECR encontramos una alta correlación entre la presencia de LIEs con inmunofenotipo aberrante y ECR tipo II, pero no así entre ECR tipo II y desarrollo de EATL. La incorporación del análisis por CF para la detección de LIEs aberrantes nos proveería de una caracterización más exhaustiva conjuntamente con los estudios por inmunohistoquímica y de clonalidad con el propósito de distinguir no sólo el tipo de ECR sino también el pronóstico respecto del desarrollo de EATL. Si consideramos las características funcionales descriptas en células CD30+ (modulación por IL-15, producción de INF-γ), su presencia en el contexto de la ECR refuerza observaciones previas en cuanto a peor pronóstico, a pesar de no haber podido correlacionar un mayor porcentaje de células CD30+ con el desarrollo de EATL en nuestra población.

PERSPECTIVAS

Si bien desde el punto de vista clínico la EC se expresa de forma similar en adultos y en niños, algunas preguntas clave continúan siendo aún objeto de investigación, como por ejemplo, entre otras ¿qué factores determinan que en algunos pacientes pediátricos se instaure tolerancia espontánea al gluten (como es el caso entre el periodo que abarca la infancia y la adolescencia) y en otros no? , ¿por qué algunas individuos no evidencian la enfermedad hasta llegada la adultez? y ¿qué determina que un porcentaje de pacientes adultos, pero no pediátricos, desarrolle ECR?.

Los resultados de la presente Tesis constituyen estudios iniciales que podrían colaborar en un futuro con el diagnóstico y seguimiento de la EC y la ECR como así también contribuir a la planificación de estrategias terapéuticas adecuadas a cada grupo particular de pacientes que padecen esta enfermedad y sus complicaciones derivadas.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Bibliografía

Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. Nat Rev Immunol. 2003 Sep;3(9):745-56.

Aizawa S, Nakano H, Ishida T, Horie R, Nagai M, Ito K, Yagita H, Okumura K, Inoue J, Watanabe T. Tumor necrosis factor receptor-associated factor_TRAF.5 and TRAF2 are involved in CD30-mediated NF-k B activation.. J Biol Chem.1997. 272: 2042- 2045.

Aizawa S, Satoh H, Horie R, Ito K, Choi SH, Takeuchi H, Watanabe T. Cloning and characterization of a cDNA for rat CD30 homolog and chromosomal assignment of the genomic gene. Gene. 1996 Dec 5;182(1-2):155-62.

Akiba H, Miyahira Y, Atsuta M, Takeda K, Nohara C, Futagawa T, Matsuda H, Aoki T, Yagita H, Okumura K. Critical contribution of OX40 ligand to T helper cell type 2 differentiation in experimental leishmaniasis. J Exp Med. 2000 Jan 17; 191(2):375-80.

Algara P, Soria C, Martinez P, Sanchez L, Villuendas R, Garcia P, Lopez C, Orradre JL, Piris MA. Value of PCR detection of TCRγ gene rearrangement in the diagnosis of cutaneous lymphocytic infiltrates. Diagn Mol Pathol 1994; 3(4):275-282.

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

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;57:1373-1378.

Allison JP, Lanier LL. The T-cel antigen receptor gamma gene: rearrangement and cell linajes. Immunol. Today 1987; 8 (10):273-296.

Alzona M, Jäck HM, Fisher RI, Ellis TM. CD30 defines a subset of activated human T cells that produce IFN-gamma and IL-5 and exhibit enhanced B cell helper activity. J Immunol. 1994 Oct 1;153(7):2861-7.

Alzona M, Hans-Martin Jack, Fisher R, Ellis TM. IL-12 Activates IFN-y Production Through the Preferential Activation of CD30+ T Cells. Journal of Immunology.1995,154: 9-

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

1 6.

Amer MH, el-Akkad SM. Gastrointestinal lymphoma in adults: clinical features and management of 300 cases. Gastroenterology 1994; 106: 846-858.

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

Apodaca G, Bomsel M, Arden J, Breitfeld PP, Tang K, Mostov KE. The polymeric immunoglobulin receptor. Amodel protein to study transcytosis. J Clin Invest.1991;87(6):1877-82.

Arch RH, Gedrich RW, Thompson CB. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)--a family of adapter proteins that regulates life and death. Genes Dev. 1998 Sep 15;12(18):2821-30.

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

Arentz-Hansen H, Körner R, Molberg O, Quarsten H, Vader W, Kooy YM, Lundin KE, Koning F, Roepstorff P, Sollid LM, McAdam SN. The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. J Exp Med. 2000 Feb 21;191(4):603-12.

Arestides RS, He H, Westlake RM, Chen AI, Sharpe AH, Perkins DL, Finn PW.Costimulatory molecule OX40L is critical for both Th1 and Th2 responses in allergic inflammation. Eur J Immunol. 2002 Oct;32(10):2874-80.

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.

Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. Nat Rev Cancer. 2002 Jun;2(6):420-30.

Ashton-Key M, Diss TC, Pan L, Du MQ, Isaacson PG. Molecular analysis of T-cell

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

clonality in ulcerative jejunitis and enteropathy-associated T-cell lymphoma. Am J Pathol. 1997 Aug;151(2):493-8.

Augustin MT, Kokkonen J, Karttunen R, Karttunen TJ. Serum granzymes and CD30 are increased in children's milk protein sensitive enteropathy and celiac disease. J Allergy Clin Immunol. 2005 Jan;115(1):157-62.

Azimi N, Brown K, Bamford RN, Tagaya Y, Siebenlist U, Waldmann TA. Human T cell lymphotropic virus type I Tax protein trans-activates interleukin 15 gene transcription through an NF-kappaB site. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Mar 3;95(5):2452-7.

Bachmann MF, Wong BR, Josien R, Steinman RM, Oxenius A, Choi Y.TRANCE, a tumor necrosis factor family member critical for CD40 ligand-independent T helper cell activation. J Exp Med. 1999 Apr 5;189(7):1025-31.

Bagdi E, Diss TC, Munson P, Isaacson PG. Mucosal intra-epithelial lymphocytes in enteropathy-associated T-cell lymphoma, ulcerative jejunitis, and refractory celiac disease constitute a neoplastic population. Blood 1999;94:260-264.

Baumann R, Yousefi S, Simon D, Russmann S, Mueller C, Simon HU. Functional expression of CD134 by neutrophils. Eur J Immunol. 2004 Aug;34(8):2268-75.

Bazan JF. Haemopoietic receptors and helical cytokines. Immunol Today. 1990 Oct;11(10):350-4.

Beckett CG, Dell'Olio D, Kontakou M, Przemioslo RT, Rosen-Bronson S, Ciclitira PJ. Analysis of interleukin-4 and interleukin-10 and their association with the lymphocytic infiltrate in the small intestine of patients with coeliac disease. Gut. 1996 Dec;39(6):818-23.

Benahmed M, Meresse B, Arnulf B, Barbe U, Mention JJ, Verkarre V, Allez M, Cellier C, Hermine O, Cerf-Bensussan N. 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. Epub 2006 Dec 16.

Berger. Allergic pathogenesis of celiac disease with studies of the splitting up of pathogenic antigens by enzymes. Bibl Paediatr 1958. 1958;6(67):1-55.

Bernardo D, Garrote JA, Allegretti Y, León A, Gómez E, Bermejo-Martin JF, Calvo C,

Riestra S, Fernández-Salazar L, Blanco-Quirós A, Chirdo F, Arranz E.Higher constitutive IL15Ra expression and lower IL-15 response threshold in coeliac disease patients. Clin Exp Immunol. 2008 Oct;154(1):64-73

Biswas P, Rovere P, De Filippi C, Heltai S, Smith C, Dagna L, Poli G, Manfredi AA, Ferrarini M. Engagement of CD30 shapes the secretion of cytokines by human gamma delta T cells. Eur J Immunol. 2000 Aug;30(8):2172-80.

Borger P, Kauffman HF, Postma DS, Esselink MT, Vellenga E. Interleukin-15 differentially enhances the expression of interferon-c and interleukin-4 in activated human (CD4+) T lymphocytes.Immunology. 1999; 96: 207–214.

Boucher L-M, Marengere LEM, Lu Y, Thurkral S, Mak TM Binding sites of cytoplasmic effectors TRAF1, 2, and 3 on CD30 and other members of the TNF receptor superfamily. Biochem Biophys Comm 1997. 233:592-600

Bowen MA, Lee RK, Miragliotta G, Nam SY, Podack ER. Structure and expression of murine CD30 and its role in cytokine production. J Immunol. 1996 Jan 15;156(2):442-9.

Brandtzaeg P, Pabst R. Let's go mucosal: communication on slippery ground. Trends Immunol. 2004 Nov;25(11):570-7.

Calderhead DM, Buhlmann JE, van den Eertwegh AJ, Claassen E, Noelle RJ, Fell HP. Cloning of mouse Ox40: a T cell activation marker that may mediate T-B cell interactions. J Immunol. 1993 Nov 15;151(10):5261-71.

Caligaris-Cappio F, Bertero MT, Converso M, Stacchini A, Vinante F, Romagnani S, Pizzolo G. Circulating levels of soluble CD30, a marker of cells producing Th2-type cytokines, are increased in patients with systemic lupus erythematosus and correlate with disease activity. Clin Exp Rheumatol. 1995 May- Jun;13(3):339-43.

Cannons JL, Choi Y, Watts TH. Role of TNF receptor-associated factor 2 and p38 mitogen-activated protein kinase activation during 4-1BB-dependent immune response. J Immunol. 2000 Dec 1;165(11):6193-204.

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

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Mar;89(3):285-90.

Carbonnel F, Grollet-Bioul L, Brouet JC, Teilhac MF, Cosnes J, Angonin R, Deschaseaux M, Châtelet FP, Gendre JP, Sigaux F. Are complicated forms of celiac disease cryptic T-cell lymphomas?. Blood.1998 Nov 15;92(10):3879-86.

Catassi C, Bearzi I, Holmes GK. Association of celiac disease and intestinal lymphomas and other cancers. Gastroenterology. 2005 Apr;128(4 Suppl 1):S79-86. Review.

Cellier C, Brousse N, Cerf-Bensussan N. Classification and outcome of refractory sprue. In: Cerf- Bensussan N, Caillat- Zucman S, Brousse N, Cellier C, Schmitz J, ed. Coeliac disease. Proceedings of the Xth International Symposium on Coeliac Disease. Paris: John Libbey Eurotext, 2003; 215-223,

Cellier C, Delabesse E, Helmer C, Patey N, Matuchansky C, Jabri B, Macintyre E, Cerf-Bensussan N, Brousse N. Refractory sprue, coeliac disease, and enteropathy associated T-cell lymphoma. French Coeliac Disease Study Group. Lancet. 2000 Jul 15;356(9225):203-8.

Cellier C, Patey N, Mauvieux L, Jabri B, Delabesse E, Cervoni JP, Burtin ML, Guy-Grand D, Bouhnik Y, Modigliani R, Barbier JP, Macintyre E, Brousse N, Cerf-Bensussan N. Abnormal intestinal intraepithelial lymphocytes in refractory sprue. Gastroenterology. 1998 Mar;114(3):471-81.

Chehade M, Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. J Allergy Clin Immunol. 2005 Jan;115(1):3-12; quiz 13.

Chen AI, McAdam AJ, Buhlmann JE, Scott S, Lupher ML Jr, Greenfield EA, Baum PR, Fanslow WC, Calderhead DM, Freeman GJ, Sharpe AH. Ox40-ligand has a critical costimulatory role in dendritic cell:T cell interactions. Immunity. 1999 Dec;11(6):689-98.

Chott A, Dragosics B, Radaszkiewicz T. Peripheral T-cell lymphomas of the intestine. Am J Pathol. 1992 Dec;141 (6):1361-71.

Chung JY, Park YC, Ye H, Wu H.All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. J Cell Sci. 2002 Feb 15;115(Pt 4):679-88.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Compaan DM, Hymowitz SG. The crystal structure of the costimulatory OX40–OX40L complex. Structure 2006;14:1321–1330.

Cosnes J, Cellier C, Viola S, Colombel JF, Michaud L, Sarles J, Hugot JP, Ginies JL, Dabadie A, Mouterde O, Allez M, Nion-Larmurier I; Groupe D'Etude et de Recherche Sur la Maladie Coeliaque. Incidence of autoimmune diseases in celiac disease: protective effect of the gluten-free diet. Clin Gastroenterol Hepatol. 2008 Jul;6(7):753-8.

Croft M. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? Nat Rev Immunol. 2003 Aug;3(8):609-20.

Croitoru K, Bienenstock J. Characteristics and functions of mucosa-associated lymphoid tissue. Hanbook of Mucosal Immunolgy. Edited by: Ogra PL, Lamm ME, McGheeJR, Mestecky J, Strober W,Bienenstock J. 1994. Ed. Academic Press. 141-149.

Daum S, Weiss D, Hummel M, Ullrich R, Heise W, Stein H, Riecken EO, Foss HD. Intestinal Lymphoma Study Group. Frequency of clonal intraepithelial T lymphocyte proliferations in enteropathy-type intestinal T cell lymphoma, coeliac disease, and refractory sprue. Gut. 2001 Dec;49 (6):804-12.

Daum S, Ullrich R, Heise W, Dederke B, Foss HD, Stein H, Thiel E, Zeitz M, Riecken EO. Intestinal non-Hodgkin's lymphoma: a multicenter prospective clinical study from the German Study Group on Intestinal non-Hodgkin's Lymphoma. J Clin Oncol. 2003 Jul 15;21(14):2740-6.

Del Prete G, De Carli M, D'Elios MM, Daniel KC, Almerigogna F, Alderson M, Smith CA, Thomas E, Romagnani S.CD30-mediated signaling promotes the development of human T helper type 2-like T cells. J Exp Med. 1995 Dec 1;182(6):1655-61.

Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. Cytokine Growth Factor Rev. 2003 Jun-Aug;14(3-4):193-209.

Dewar DH, Ciclitira PJ. Clinical features and diagnosis of celiac disease. Gastroenterology. 2005 Apr;128(4 Suppl 1):S19-24.

Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D.Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. Nat Med.

1997 Jul;3(7):797-801.

Diosdado B, van Oort E, Wijmenga C. "Coelionomics": towards understanding the molecular pathology of coeliac disease. Clin Chem Lab Med. 2005;43(7):685-95.

Di Sabatino A, Bertrandit E, Casadei Maldini M,Pennese F,Proiettit F,Corazza G. Phenotyping of peripheral blood lymphocytes in adult celiac disease. Immunology 1998; 95: 572-576.

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

Di Sabatino A, Corazza GR. Coeliac disease. Lancet 2009 Apr 25;373(9673):1480–93.

Diss TC, Watts M, Pan LX, Burke M, Linch D, Isaacson PG. The polimerasa chain reaction in the demostration of monoclonality in T cell lymphomas. J. Clin. Path. 1995; 48: 1045-1050.

Dubois S, Mariner J, Waldmann TA, Tagaya Y. IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells. Immunity. 2002 Nov;17(5):537-47.

Duckett CS, Gedrich RW, Gilfillan MC, Thompson CB. Induction of nuclear factor kB by the CD30 receptor is mediated by TRAF1 and TRAF2. Mol Cell Biol. 1997. 17:1535-1542.

Ebert EC. Interleukin 15 is a potent stimulant of intraepithelial lymphocytes. Gastroenterology. 1998 Dec;15(6):1439-45.

Eiras P, León F, Camarero C, Roy G. Intraepithelial lymphocytes in the diagnosis of latent-potential celiac disease. Rev Clin Esp. 2002 Sep;202(9):497-9.

Eiras P, Roldán E, Camarero C, Olivares F, Bootello A, Roy G. Flow Cytometry Description of a Novel CD32/CD71 Intraepithelial Lymphocyte Subset in Human Duodenal Biopsies: Potential Diagnostic Value in Coeliac Disease. Cytometry (Communications in Clinical Cytometry) 1998. 34:95–102

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Ellis HJ, Ciclitira PJ. In vivo gluten challenge in celiac disease. Can J Gastroenterol. 2001 Apr;15(4):243-7.

Ellis TM, Simms PE, Slivnick DJ, Jäck HM, Fisher RI. CD30 is a signal-transducing molecule that defines a subset of human activated CD45RO+ T cells. J Immunol. 1993 Sep 1;151(5):2380-9.

Fais S, Maiuri L, Pallone F. Gliadin-induced changes in the expression of MHC-class II antigens by human small intestinal epithelium. Organ culture studies with celiac disease mucosa. Gut 1992; 33: 472-475.

Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. Clin Dev Immunol. 2006 Jun-Dec;13(2-4):143-57.

Farstad IN, Johansen FE, Vlatkovic L, Jahnsen J, Scott H, Fausa O, Bjørneklett A, Brandtzaeg P, Halstensen TS. Heterogeneity of intraepithelial lymphocytes in refractory sprue: potential implications of CD30 expression. Gut. 2002 Sep;51 (3):372-8.

Farstad IN, Halstensen TS, Lien B, Kilshaw PJ, Lazarovits AI, Brandtzaeg P, Lazarovitz AI. Distribution of beta 7 integrins in human intestinal mucosa and organized gut-associated lymphoid tissue. Immunology. 1996;89(2):227-37.

Fattovich G, Vinante F, Giustina G, Morosato L, Alberti A, Ruol A, Pizzolo G. Serum levels of soluble CD30 in chronic hepatitis B virus infection. Clin Exp Immunol. 1996 Jan;103(1):105-10.

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

Ferguson A. Intraepithelial lymphocytes of the small intestine. Gut. 1977 Nov;18 (11):921-37.

Ferguson A, Arranz E, O`Mahony S. Clinical and pathological spectrum of celiac disease-active, silent, latent, potential. Gut 1993; 34:150-1.

Ferguson A, Murray D. Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human jejunum. Gut. 1971 Dec; 12 (12):988-94.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Fina D, Sarra M, Caruso R, Del Vecchio Blanco G, Pallone F, MacDonald TT, Monteleone G.

Interleukin 21 contributes to the mucosal T helper cell type 1 response in coeliac disease. Gut. 2008 Jul;57(7):887-92. Epub 2007 Oct 26.

Forsberg G, Hernell O, Melgar S, Israelsson A, Hammarström S, Hammarström ML. Paradoxical coexpression of proinflammatory and down-regulatory cytokines in intestinal T cells in childhood celiac disease. Gastroenterology. 2002 Sep;123(3):667-78

Gale J, Simmonds PD, Mead GM, Sweetenham JW, Wright DH. Enteropathy-type intestinal T-cell lymphoma: clinical features and treatment of 31 patients in a single center. J Clin Oncol. 2000;18(4):795-803.

Garrote JA, Gómez-González E, Bernardo D, Arranz E, Chirdo F. Celiac disease pathogenesis: the proinflammatory cytokine network. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2008 Aug;47 Suppl 1:S27-32.

Gaspal FM, Kim MY, McConnell FM, Raykundalia C, Bekiaris V, Lane PJ. Mice Deficient in OX40 and CD30 Signals Lack MemoryAntibody Responses because of Deficient CD4 T Cell Memory.J Immunol. 2005 Apr 1;174(7):3891-6.

Gedrich RW, Gilfillan MC, Ducket CS, Van Dongen JL, Thompson CB. CD30 contains two binding sites with different specificities for members of the tumor necrosis factor receptor-associated factor family of signal transducing proteins. J Biol Chem1996. 271:12852- 12858.

Gerli R, Pitzalis, Bistoni O, Falini B, Costantini V, Russano A, Lunardi C. CD30+T Cells in Rheumatoid Synovitis: Mechanisms of Recruitment and Functional Role. The Journal of Immunology, 2000, 164: 4399–4407.

Gerli R, Lunardi C, Vinante F, Bistoni O, Pizzolo G, Pitzalis C. Role of CD30+ T cells in rheumatoid arthritis: a counter-regulatory paradigm for Th1-driven diseases. Trends Immunol. 2001 Feb;22(2):72-7.

Gilfillan MC, Noel PJ, Podack ER, Reiner SL, Thompson CB. Expression of the costimulatory receptor CD30 is regulated by both CD28 and cytokines. J Immunol. 1998 Mar 1;160(5):2180-7.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Gillett HR, Arnott ID, McIntyre M, Campbell S, Dahele A, Priest M, Jackson R, Ghosh S. Successful infliximab treatment for steroid-refractory celiac disease: a case report. Gastroenterology. 2002 Mar; 122 (3):800-5.

Gjertsen HA, Sollid LM, Ek J, Thorsby E, Lundin KE. T cells from the peripheral blood of coeliac disease patients recognize gluten antigens when presented by HLA-DR, -DQ, or -DP molecules.Scand J Immunol. 1994 Jun;39(6):567-74.

Godfrey WR, Fagnoni FF, Harara MA, Buck D, Engleman EG. Identification of a human OX-40 ligand, a costimulator of CD4+ T cells with homology to tumor necrosis factor. J Exp Med. 1994 Aug 1;180(2):757-62.

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

Gomez JC, Selvaggio GS, Viola M, Pizarro B, la Motta G, de Barrio S, Castelletto R, Echeverría R, Sugai E, Vazquez H, Mauriño E, Bai JC. Prevalence of celiac disease in Argentina: screening of an adult population in the La Plata area. Am J Gastroenterol. 2001 Sep;96 (9):2700-4.

Gommerman JL, Browning JL. Lymphotoxin/light, lymphoid microenvironments and autoimmune disease. Nat Rev Immunol. 2003 Aug;3(8):642-55.

González L. www.nutrar.com Curso de educación a distancia. Actualidad y avances en Enfermedad Celíaca. 2004, Argentina.

Grabstein, K.H., J. Eisenman, K. Shanebeck, C. Rauch, S.Srinivasan, V. Fung, C. Beers, J. Richardson, M.A. Schoenborn,M. Ahdieh, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor.Science.1994; 264:965–968.

Gramaglia I, Weinberg AD, Lemon M, Croft M. OX-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses. J Immunol. 1998 Dec 15;161(12):6510-7.

Greco L, Romino R, Coto I, Di Cosmo N, Percopo S, Maglio M, Paparo F, Gasperi V, Limongelli MG, Cotichini R, D'Agate C, Tinto N, Sacchetti L, Tosi R, Stazi MA. The first large population based twin study of celiac disease. Gut. 2002 May;50 (5):624-8.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Green PH, Rostami K, Marsh MN. Diagnosis of coeliac disease. Best PractRes Clin Gastroenterol. 2005;19: 389–400.

Gruss H-J, Herrmann F. CD30 ligand, a member of the TNF ligand superfamily, with growth and activation control CD30+ lymphoid and lymphoma cells. Leuk Lymphoma. 1996 Feb;20(5-6):397-409.

Halstensen TS, Brandtzaeg P. Activated T lymphocytes in the celiac lesion: non-proliferative activation (CD25) of CD4+ alpha/beta cells in the lamina propria but proliferation (Ki-67) of alpha/beta and gamma/delta cells in the epithelium. Eur J Immunol. 1993 Feb;23(2):505-10.

Halstensen TS, Farstad IN, Scott H, Fausa O, Brandtzaeg P. Intraepithelial TcR alpha/beta+ lymphocytes express CD45RO more often than the TcR gamma/delta+ counterparts in coeliac disease. Immunology. 1990 Dec;71(4):460-6.

Hansen HP, Kisseleva T, Kobarg J, Horn-Lohrens O, Havsteen B, Lemke H. A zinc metalloproteinase is responsible for the release of CD30 on human tumor cell lines. Int J Cancer. 1995 Nov 27;63(5):750-6.

Hansson T, Dannaeus A, Klareskog L. Cytokine-producing cells in peripheral blood of children with coeliac disease secrete cytokines with a type 1 profile. Clin Exp Immunol. 1999 May; 116(2):246-50.

Harlin H, Podack E, Boothby M, Alegre ML: TCR-independent CD30 signaling selectively induces IL-13 production via a TNF receptor-associated factor/p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. J Immunol 2002. 169:2451-2459. The authors of this study demonstrate that dominant-negative TRAF-2 selectively inhibits CD30-mediated activation of JNK and p38 MAPK without affecting NF-kB activation.

Harris KM, Fasano A, Mann DL. Monocytes differentiated with IL-15 support Th17 and Th1 responses to wheat gliadin: Implications for celiac disease. Clin Immunol. 2010 Jun; 135(3):430-9. Epub 2010 Feb 11.

Hernandez L, Green PH. Extraintestinal manifestations of celiac disease. Curr Gastroenterol Rep. 2006 Oct;8(5):383-9.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Horie R, Watanabe T. CD30: expression and function in health and disease. Semin Immunol. 1998 Dec;10(6):457-70.

Howdle PD, Jalal PK, Holmes GKT, Houlston RS. Primary small-bowel malignancy in the UK and its association with coeliac disease. Q J Med. 2003; 96:345-353.

Howdle PD, Corazza GR, Bullen AW, Losowsky MS. Gluten sensitivity of small intestinal mucosa in vitro: quantitative assessment of histologic change. Gastroenterology. 1981 Mar;80(3):442-50.

Howell WM, Leung ST, Jones DB, Nakshabendi I, Hall MA, Lanchbury JS, Ciclitira PJ, Wright DH. HLA-DRB, -DQA, and -DQB polymorphism in celiac disease and enteropathy-associated T-cell lymphoma. Common features and additional risk factors for malignancy. Hum Immunol. 1995 May;43(1):29-37.

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

Iannone F, Corrigall VM, Kingsley GH, Panayi GS. Evidence for the continuous recruitment and activation of T cells into the joints of patients with rheumatoid arthritis. Eur J Immunol. 1994 Nov;24(11):2706-13.

Imura A, Hori T, Imada K, Ishikawa T, Tanaka Y, Maeda M, Imamura S, Uchiyama T. The human OX40/gp34 system directly mediates adhesion of activated T cells to vascular endothelial cells. J Exp Med. 1996 May 1;183(5):2185-95.

Isaacson P. Relation between cryptic intestinal lymphoma and refractory sprue. Commentary. Lancet 2000;356:178-179.

Isaacson PG, O'Connor NTJ, Spencer J, Bevan DH,Connolly CE, Kirkham N, Pollock DJ, Wainscoat JS,Stein H, Mason DY: Malignant histiocytosis of the intestine: a T-cell lymphoma. Lancet 1985, 2:688-691

Isaacson PG, Wright DH, Ralfkiaer E. Enteropathy-type T-cell lymphoma. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, World Health Organization, eds. Classification of tumours: pathology and Genetics of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC press; 2001:208-209.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Isaacson P, Chott A, Ott G, Stein H. Enteropathy-associated T-cell lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Thiele J. editors. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissue. 4th ed.Lyon, France: IARC Press; 2008. p. 289–91.

Ishii N, Ndhlovu LC, Murata K, Sato T, Kamanaka M, Sugamura K. OX40 (CD134) and OX40 ligand interaction plays an adjuvant role during in vivo Th2 responses. Eur J Immunol. 2003 Sep;33(9):2372-81.

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

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

Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD. El Sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. 2000. Editores. Immunobiología. 4ª Edición.

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

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

Josien R, Li HL, Ingulli E, Sarma S, Wong BR, Vologodskaia M, Steinman RM, Choi Y. TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo. J Exp Med. 2000 Feb 7;191(3):495-502.

Josimovic-Alasevic O, Dürkop H, Schwarting R, Backé E, Stein H, Diamantstein T.Ki-1 (CD30) antigen is released by Ki-1-positive tumor cells in vitro and in vivo. I. Partial characterization of soluble Ki-1 antigen and detection of the antigen in cell culture supernatants and in serum by an enzyme-linked immunosorbent assay. Eur J Immunol. 1989 Jan;19(1):157-62.

Kemppainen T, Kröger H, Janatuinen E, Arnala I, Lamberg-Allardt C, Kärkkäinen M, Kosma VM, Julkunen R, Jurvelin J, Alhava E, Uusitupa M. Bone recovery after a gluten-free diet: a 5-year follow-up study. Bone. 1999 Sep;25(3):355-60.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Kanegane H, Tosato G. Activation of naive and memory T cells by interleukin-15. Blood. 1996 Jul 1;88(1):230-5.

Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and dath. Nat Immunol. 2002 Mar;3(3):221-7.

Kelsall BL; Strober W. Host defenses at mucosal surfaces. En: Rich RR, editor in chief. Clinical immunology. Principles and practice. Ed. Mosby.1996. Vol.I, p. 299-329.

Kennedy MK, Willis CR, Armitage RJ. Deciphering CD30 ligand biology and its role in humoral immunity. Immunology. 2006 Jun;118(2):143-52.

Kerttula TO, Hällström O, Mäki M. Phenotypical characterization of peripheral blood T cells in patients with coeliac disease: elevation of antigen-primed CD45RO+ T lymphocytes. Immunology.1995 Sep; 86(1):104-9.

Kollias G, Kontoyiannis D. Role ofTNF/TNFRin autoimmunity: Specific TNF receptor blockade may be advantageous to anti-TNF treatments. Cytokine Growth Factor Rev. 2002. 13:315–21.

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

Koning F, Schuppan D, Cerf-Bensussan N, Sollid LM. Pathomechanisms in celiac disease. Best.Pract.Res.Clin.Gastroenterol. 2005;19:373-387.

Lammers KM, Lu R, Brownley J, Lu B, Gerard C, Thomas K, Rallabhandi P, Shea-Donohue T, Tamiz A, Alkan S, Netzel-Arnett S, Antalis T, Vogel SN, Fasano A. Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. Gastroenterology. 2008 Jul;135(1):194-204.

Lee SY, Lee SY, Kandala G, Liou M-L, Choi Y. CD30 rTNF receptor-associated factor interaction: NF- kappa B activation and binding specificity. Proc Natl Acad Sci 1996. 93:9699-9703

León AJ, Garrote JA, Blanco-Quirós A, Calvo C, Fernández-Salazar L, Del Villar A, Barrera A, Arranz E. Interleukin 18 maintains a long-standing inflammation in coeliac

disease patients. Clin Exp Immunol. 2006 Dec;146(3):479-85.

Leon F, Roy G. On the complexity of human CD3- intraepithelial lymphocytes. Gastroenterology. 2004 Apr; 126(4):1217-8.

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. Cell. 2001 Feb 23; 104(4):487-501.

Lodolce JP, Burkett PR, Boone DL, Chien M, Ma A. T cell-independent interleukin 15Ralpha signals are required for bystander proliferation. J Exp Med. 2001 Oct 15; 194(8):1187-94.

Lundin KE, Scott H, Hansen TS, Fausa. Thorsby E, Sollid LM..Gliadin-specific, HLADQ (A1*0501, B1*0201) restricted T cells from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. J Exp Med 1993; 178:187-196).

Ma A, Boone DL, Lodolce JP. The pleiotropic functions of interleukin 15: not so interleukin 2-like after all. J. Exp. Med. 2000. Mar 6;191 (5):753–756

MacDonald TT. The mucosal immune system. Parasite Immunol. 2003;25(5):235-46.

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

MacDonald TT, Spencer J. Gut associated lymphoid tissue. En: Hanbook of Mucosal Immunolgy. Edited by Ogra PL, Lamm ME, McGheeJR, Mestecky J, Strober W, Bienenstock J. 1994. Ed. Academic Press. 415-424.

Mackay F, Kalled SL. TNF ligands and receptors in autoimmunity: an update. Curr Opin Immunol. 2002 Dec;14(6):783-90.

Mahadeva S, Wyatt JI, Howdle PD. Is a raised intraepithelial lymphocyte count with normal duodenal villous architecture clinically relevant? J Clin Pathol. 2002 Jun;55(6):424-8

Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Rispo A, Griffin M, Issekutz T, Quaratino S, Londei M. Unexpected role of surface transglutaminase type II in celiac disease. Gastroenterology. 2005 Nov;129(5):1400-13.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

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

Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S, Picard J, Osman M, Quaratino S, Londei M. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. Lancet. 2003 Jul 5;362(9377):30-7.

Maiuri L, Luciani A, Villella VR, Vasaturo A, Giardino I, Pettoello-Mantovani M, Guido S, Cexus ON, Peake N, Londei M, Quaratino S. Lysosomal accumulation of gliadin p31-43 peptide induces oxidative stress and tissue transglutaminase-mediated PPARgamma downregulation in intestinal epithelial cells and coeliac mucosa. Gut. 2010 Mar;59(3):311-9.

Maiuri L, Picarelli A, Boirivant M, Coletta S, Mazzilli MC, De Vincenzi M, Londei M, Auricchio S. Definition of the initial immunologic modifications upon in vitro gliadin challenge in the small intestine of celiac patients. Gastroenterology. 1996 May;110(5):1368-78.

Mäki M, Collin P. Coeliac disease. Lancet. 1997 Jun 14;349(9067):1755-9.

Mallett S, Fossum S, Barclay AN.Characterization of the MRC OX40 antigen of activated CD4 positive T lymphocytes--a molecule related to nerve growth factor receptor. EMBO J. 1990 Apr;9(4):1063-8.

Marsh MN. Studies of intestinal lymphoid tissue. XV. Histopathologic features suggestive of cell-mediated reactivity in jejunal mucosae of patients with dermatitis herpetiformis. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. 1989;416(2):125-32.

Marsh MN. The immunopathology of the small intestinal reaction in gluten-sensitivity. Immunol Invest. 1989 Jan-May;18(1-4):509-31.

Marsh MN, Bjarnason I, Shaw J, Ellis A, Baker R, Peters TJ. Studies of intestinal lymphoid tissue. XIV-- HLA status, mucosal morphology, permeability and epithelial lymphocyte populations in first degree relatives of patients with coeliac disease. Gut. 1990 Jan;31(1):32-6.

Marsh MN, Hinde J. Morphometric analysis of small intestinal mucosa. III. The quantitation of crypt epithelial volumes and lymphoid cell infiltrates, with reference to celiac

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

sprue mucosae. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. 1986;409(1):11-22.

Matysiak-Budnik T, Malamut G, de Serre NP, Grosdidier E, Seguier S, Brousse N, Caillat-Zucman S, Cerf-Bensussan N, Schmitz J, Cellier C. Long-term follow-up of 61 coeliac patients diagnosed in childhood: evolution toward latency is possible on a normal diet. Gut. 2007 Oct;56(10):1379-86.

Matsumoto K, Terakawa M, Miura K, Fukuda S, Nakajima T, Saito H. Extremely rapid and intense induction of apoptosis in human eosinophils by anti-CD30 antibody treatment in vitro. J Immunol. 2004 Feb 15;172(4):2186-93.

Mauriño E, Niveloni S, Cherñavsky A, Pedreira S, Mazure R, Vazquez H, Reyes H, Fiorini A, Smecuol E, Cabanne A, Capucchio M, Kogan Z, Bai JC. Azathioprine in refractory sprue: results from a prospective, open-label study. Am J Gastroenterol. 2002 Oct; 97(10):2595-602.

Mazzarella G, MacDonald TT, Salvati VM, Mulligan P, Pasquale L, Stefanile R, Lionetti P, Auricchio S, Pallone F, Troncone R, Monteleone G. Constitutive activation of the signal transducer and activator of transcription pathway in celiac disease lesions. Am J Pathol. 2003 Jun;162(6):1845-55.

Mc Carthy KP, Sloane JP, Kabarowski JH, Matutes E, Wiedemann LM. A simplified method of detection of clonal rearrangements of the T-cell receptor- γ-chain gene. Diagn. Mol.Pathol. 1992:173-9.

McGhee JR, Mestecky J, Dertzbaugh MT,Eldridge JH, Hirasawa M, Kiyono H. The mucosal immune system: from fundamental concepts tovaccine development. Vaccine. 1992;10(2):75-88.

McInnes IB, al-Mughales J, Field M, Leung BP, Huang FP, Dixon R, Sturrock RD, Wilkinson PC, Liew FY. The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. Nat Med. 1996 Feb;2 (2):175-82.

Meijer JW, Mulder CJ, Goerres MG, Boot H, Schweizer JJ. (Coeliac disease and extra) intestinal T-cell lymphomas: definition, diagnosis and treatment. Scand J Gastroenterol Suppl. 2004;(241):78-84.

Mention JJ, Ben Ahmed M, Bègue B, Barbe U, Verkarre V, Asnafi V, Colombel JF,

Cugnenc PH, Ruemmele FM, McIntyre E, Brousse N, Cellier C, Cerf-Bensussan N. Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. Gastroenterology. 2003 Sep;125(3):730-45.

Meresse B, Chen Z, Ciszewski C, Tretiakova M, Bhagat G, Krausz TN, Raulet DH, Lanier LL, Groh V, Spies T, Ebert EC, Green PH, Jabri B. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. Immunity. 2004 Sep;21(3):357-66.

Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection?. Nat Rev Immunol. 2004 Nov;4(11):841-55. Review

Miranda-Carús ME, Benito-Miguel M, Llamas MA, Balsa A, Martín-Mola E. Human T cells constitutively express IL-15 that promotes ex vivo T cell homeostatic proliferation through autocrine/juxtacrine loops. J Immunol. 2005 Sep 15;175(6):3656-62.

Monteleone G, Pender SL, Alstead E, Hauer AC, Lionetti P, McKenzie C, MacDonald TT. Role of interferon alpha in promoting T helper cell type 1 responses in the small intestine in coeliac disease. Gut. 2001 Mar;48(3):425-9.

Monteleone I, Sarra M, Del Vecchio Blanco G, Paoluzi OA, Franzè E, Fina D, Fabrizi A, MacDonald TT, Pallone F, Monteleone G. Characterization of IL-17A-producing cells in celiac disease mucosa. J Immunol. 2010 Feb 15;184(4):2211-8. Epub 2010 Jan 8.

Mora S, Barera G, Ricotti A, Weber G, Bianchi C, Chiumello G.Reversal of low bone density with a gluten-free diet in children and adolescents with celiac disease. Am J Clin Nutr. 1998 Mar;67(3):477-81.

Mowat AM 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. Nat Rev Immunol 3:331-341.

Mrózek E, Anderson P, Caligiuri MA.Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. Blood. 1996 Apr 1;87(7):2632-40.

Mulder CJ, Wahab PJ, Moshaver B, Meijer JW. Refractory celiac disease: a window between coeliac disease and enteropathy-associated T-cell lymphoma. Scand J Gastroentrol 2000;232:32-37.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Murata K, Ishii N, Takano H, Miura S, Ndhlovu LC, Nose M, Noda T, Sugamura K. Impairment of antigen-presenting cell function in mice lacking expression of OX40 ligand. J Exp Med. 2000 Jan 17;191(2):365-74.

Murray A, Cuevas EC, Jones DB, Wright DH. Study of the immunohistochemistry and T cell clonality of enteropathy-associated T cell lymphoma. Am J Pathol. 1995. Feb;146(2):509-19.

Murray JA, Green PH. Biopsy is the gold standard of diagnosis of celiac sprue. Gastroenterology. 1999 May;116(5):1273-4.

Muta H, Boise LH, Fang L, Podack ER. CD30 signals integrate expression of cytotoxic effector molecules, lymphocyte trafficking signals, and signals for proliferation and apoptosis. J Immunol. 2000 Nov 1;165 (9):5105-11.

Nadali G, Vinante F, Stein H, Todeschini G, Tecchio C, Morosato L, Chilosi M, Menestrina F, Kinney MC, Greer JP, et al. Serum levels of the soluble form of CD30 molecule as a tumor marker in CD30+ anaplastic large-cell lymphoma. J Clin Oncol. 1995 Jun;13(6):1355-60.

Nakamura T, Lee RK, Nam SY, Al-Ramadi BK, Koni PA, Bottomly K, Podack ER, Flavell RA. Reciprocal regulation of CD30 expression on CD4+ T cells by IL-4 and IFN-gamma. J Immunol. 1997 Mar 1;158(5):2090-8.

Nawrocki JF, Kirsten ES, Fisher RI. Biochemical and structural properties of a Hodgkin's disease-related membrane protein. J Immunol. 1988 Jul 15;141(2):672-80.

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

Nohara C, Akiba H, Nakajima A, Inoue A, Koh CS, Ohshima H, Yagita H, Mizuno Y, Okumura K. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis with anti-OX40 ligand monoclonal antibody: a critical role for OX40 ligand in migration, but not development, of pathogenic T cells. J Immunol. 2001 Feb 1;166(3):2108-15.

Norris JM, Barriga K, Hoffenberg EJ, Taki I, Miao D, Haas JE, Emery LM, Sokol RJ,

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Erlich HA, Eisenbarth GS, Rewers M. 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.

Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. The histopathology of celiac disease: time for a standardized report scheme for pathologist. Eur J Gastroenterol Hepatol 1999. 11:1185-94.

O'Farrelly C, Feighery C, O'Brian DS, Stevens F, Connolly CE, McCarthy C, Weir DG: Humoral response to wheat protein in patients with coeliac disease and enteropathy-associated T-cell lymphoma. Br Med J 1986, 293:908-910.

Ohshima Y, Tanaka Y, Tozawa H, Takahashi Y, Maliszewski C, Delespesse G. Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells. J Immunol. 1997 Oct 15;159(8):3838-48.

Ohshima Y, Yang LP, Uchiyama T, Tanaka Y, Baum P, Sergerie M, Hermann P, Delespesse G.OX40 costimulation enhances interleukin-4 (IL-4) expression at priming and promotes the differentiation of naive human CD4(+) T cells into high IL-4-producing effectors. Blood. 1998 Nov 1;92 (9):3338-45.

Okumura M, Hidaka Y, Kuroda S, Takeoka K, Tada H, Amino N. Increased serum concentration of soluble CD30 in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. J Clin Endocrinol Metab. 1997 Jun;82(6):1757-60.

O’Mahony S Vestey JP, Ferguson A. Similarities in intestinal humoral immunity in dermatitis herpetiformis without enteropathy and in celiac disease. Lancet 1990; 335: 1487-1490.

Park JH, Yu Q, Erman B, Appelbaum JS, Montoya-Durango D, Grimes HL, Singer A. Suppression of IL7Ralpha transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7- dependent T cell survival.Immunity.2004 Aug;21(2):289-302.

Paterson DJ, Jefferies WA, Green JR, Brandon MR, Corthesy P, Puklavec M, Williams AF. Antigens of activated rat T lymphocytes including a molecule of 50,000 Mr detected only on CD4 positive T blasts. Mol Immunol. 1987 Dec;24(12):1281-90.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Patey-Mariaud De Serre N, Cellier C, Jabri B, Delabesse E, Verkarre V, Roche B, Lavergne A, Brière J, Mauvieux L, Leborgne M, Barbier JP, Modigliani R, Matuchansky C, MacIntyre E, Cerf-Bensussan N, Brousse N. Distinction between coeliac disease and refractory sprue: a simple immunohistochemical method. Histopathology. 2000 Jul;37(1):70-7.

Paulley JW. Observation on the aetiology of idiopathic steatorrhoea; jejunal and lymph-node biopsies.Br Med J. 1954 Dec 4;2(4900):1318-21.

Pellegrini P, Berghella AM, Contasta I, Adorno D. CD30 antigen: not a physiological marker for TH2 cells but an important costimulator molecule in the regulation of the balance between TH1/TH2 response. Transpl Immunol. 2003 Oct-Nov;12(1):49-61.

Periolo N, Guillén L, Bernardo D, Niveloni SI, Hwang HJ, Garrote JA, Bai JC, Arranz E, Cherñavsky AC. Altered expression of the lymphocyte activation antigen CD30 in active celiac disease. Autoimmunity. 2010 Jun;43(4):288-98.

Peter JS. Autoantibodies. 1996. Elsevier.

Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. Cytokine Growth Factor Rev. 2003 Jun-Aug;14 (3-4):185-91.

Prell RA, Evans DE, Thalhofer C, Shi T, Funatake C, Weinberg AD. OX40-mediated memory T cell generation is TNF receptorassociated factor 2 dependent. J Immunol 2003;171:5997–6005.

Quezada SA, Jarvinen LZ, Lind EF, Noelle RJ. CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. Annu Rev Immunol. 2004;22:307-28.

Report of a working group of the United European Gastroenterology Week in Amsterdam When is a coeliac a coeliac?. Eur J Gastroenterol Hepatol. 20011123-1128.),

Riestra S, Fernández E, Rodrigo L. Liver involvement in coeliac disease. Rev Esp Enferm Dig. 1999 Dec;91(12):846-52.

Rogers PR, Song J, Gramaglia I, Killeen N, Croft M. OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. Immunity 2001;15:445–455.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Romagnani S, Del Prete G, Maggi E, Chilosi M, Caligaris-Cappio F, Pizzolo G. CD30 and type 2 T helper (Th2) responses. J Leukoc Biol. 1995 May;57(5):726-30.

Rubin C, Brandborg LL, Phelps PC, Tylor HC. Studies of celiac disease. Part I. The apparent identical and specific nature of the duodenal and proximal jejunal lesion in celiac disease and idiopathic sprue. Gastroenterology 1960; 38: 28-38.

Ruprecht CR, Gattorno M, Ferlito F, Gregorio A, Martini A, Lanzavecchia A, Sallusto F. Coexpression of CD25 and CD27 identifies FoxP3+ regulatory T cells in inflamed synovia. J Exp Med. 2005 Jun 6;201(11):1793-803.

Sakula J, Shiner M. Coeliac disease with atrophy of the small lintestine mucosa. Lancet 1957; .273: 876-877.

Salvati VM, MacDonald TT, Bajaj-Elliott M, Borrelli M, Staiano A, Auricchio S, Troncone R, Monteleone G. Interleukin 18 and associated markers of T helper cell type 1 activity in coeliac disease. Gut. 2002 Feb;50(2):186-90.

Salvati VM, Mazzarella G, Gianfrani C, Levings MK, Stefanile R, De Giulio B, Iaquinto G, Giardullo N, Auricchio S, Roncarolo MG, Troncone R. Recombinant human interleukin 10 suppresses gliadin dependent T cell activation in ex vivo cultured coeliac intestinal mucosa. Gut. 2005 Jan;54(1):46-53.

Sancho D, Yáñez-Mó M, Tejedor R, Sánchez-Madrid F. Activation of peripheral blood T cells by interaction and migration through endothelium: role of lymphocyte function antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-15. Blood. 1999 Feb 1;93(3):886-96.

Sanders DS, Carter MJ, Hurlstone DP, Pearce A, Ward AM, McAlindon ME, Lobo AJ. Association of adult coeliac disease with irritable bowel syndrome: a case-control study in patients fulfilling ROME II criteria referred to secondary care. Lancet. 2001 Nov 3;358(9292):1504-8.

Sanders DS, Patel D, Stephenson TJ, Ward AM, McCloskey EV, Hadjivassiliou M, Lobo AJ.A primary care cross-sectional study of undiagnosed adult coeliac disease. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2003 Apr;15(4):407-13.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Sanders DS, Hurlstone DP, Stokes RO, Rashid F, Milford-Ward A, Hadjivassiliou M, Lobo AJ. Changing face of adult coeliac disease: experience of a single university hospital in South Yorkshire. Postgrad Med J. 2002 Jan;78(915):31-3.

Santee SM, Owen-Schaub LB. Human tumor necrosis factor receptor p75/80 (CD120b) gene structure and promoter characterization. J Biol Chem. 1996 Aug 30;271(35):21151-9.

Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, Lefrançois L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. Nat Immunol.2000 Nov;1(5):426-32.

Schwab U, Stein H, Gerdes J, Lemke H, Kirchner H, Schaadt M, Diehl V. Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg-Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. Nature 1982;299: 65-67.

Shewry PR, Halford NG. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. J Exp Bot. 2002 Apr;53(370):947-58.

Shiner M, Doniach I. Histopathologic studies in steatorrhea. Gastroenterology. 1960 Mar; 38: 419-40.

Sillett HK, Southgate J, Howdle PD, Trejdosiewicz LK. Expression of activation and costimulatory elements by human intestinal intraepithelial lymphocytes. Scand J Immunol. 1999 Jul;50(1):52-60.

Smith, C.A, K. Grabstein, T. Davis, B. Gliniak, I. McAlister, D. Anderson, S. Gimpel, D. Williams, R. Armitage, and R. G. Goodwin. Molecular cloning and characterization of a ligand for the CD30 antigen.1993. Blood 80:150a.

So T, Lee SW, Croft M. Immune regulation and control of regulatory T cells by OX40 and 4-1BB. Cytokine Growth Factor Rev. 2008 Jun-Aug;19(3-4):253-62.

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.

Sollid LM, Thorsby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. Gastroenterology.1993 Sep;105(3):910-22.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Song J, Salek-Ardakani S, Rogers PR, Cheng M, Van Parijs L, Croft M. The costimulation – regulated duration of PKB activation controls T cell longevity. Nat Immun 2004; 5:150–158.

Song J, So T, Croft M. Activation of NF-kappaB1 by OX40 contributes to antigen-driven T cell expansion and survival. J Immunol 2008;180:7240–7248.

Spencer J, Cerf-Bensussan N, Jarry A, Brousse N, Guy-Grand D, Krajewski AS, Isaacson PG. Enteropathy-associated T cell lymphoma (malignant histiocytosis of the intestine) is recognized by a monoclonal antibody (HML-1) that defines a membrane molecule on human mucosal lymphocytes. Am. J. Pathol. 1988; 132: 1 -5.

Strober W, Fuss I, Boirivant M, Kitani A. Insights into the mechanism of oral tolerance derived from the study of models of mucosal inflammation. Ann N Y Acad Sci. 2004 Dec; 1029:115-31.

Stüber E, Neurath M, Calderhead D, Fell HP, Strober W. Cross-linking of OX40 ligand, a member of the TNF/NGF cytokine family, induces proliferation and differentiation in murine splenic B cells. Immunity. 1995 May;2(5):507-21.

Stüber E, Büschenfeld A, Lüttges J, Von Freier A, Arendt T, Fölsch UR.The expression of OX40 in immunologically mediated diseases of the gastrointestinal tract (celiac disease, Crohn's disease, ulcerative colitis). Eur J Clin Invest. 2000 Jul;30(7):594-9.

Sturgess RP, Ellis HJ, Ciclitira PJ. Cereal chemistry, molecular biology, and toxicity in coeliac disease. Gut. 1991 Sep;32(9):1055-60.

Takeda I, Ine S, Killeen N, Ndhlovu LC, Murata K, Satomi S, Sugamura K, Ishii N. Distinct roles for the OX40-OX40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells. J Immunol. 2004 Mar 15;172(6):3580-9.

Tarkowski M, Chrul S, Bodalski J. The effect of IL-18 on IL-12-induced CD30 expression and IL-4 and IFN-gamma production by allergen and PPD specific T cells. Clin Exp Immunol. 2002 Jan;127(1):78-84.

Tjon JM, Verbeek WH, Kooy-Winkelaar YM, Nguyen BH, van der Slik AR, Thompson A, Heemskerk MH, Schreurs MW, Dekking LH, Mulder CJ, van Bergen J, Koning F.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Defective synthesis or association of T-cell receptor chains underlies loss of surface T-cell receptor-CD3 expression in enteropathy-associated T-cell lymphoma. Blood. 2008 Dec 15;112(13):5103-10. Epub 2008 Sep 24.

Toennies HM, Green JM, Arch RH. Expression of CD30 and Ox40 on T lymphocyte subsets is controlled by distinct regulatory mechanisms. J Leukoc Biol. 2004 Feb;75(2):350-7. Epub 2003 Nov 21.

Tough D, Sprent J. Turnover of naive- and memory-phenotype T Cells. J Exp Med. 1994 Apr 1; 179(4):1127-35.

Trier JS. Celiac sprue. N Engl J Med.1991;325:1709-19.

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

Trier JS, Falchuk ZM, Carey MC, Schreiber DS. Celiac sprue and refractory sprue. Gastroenterology 1978;75:307-16.

Troncone R. Latent coeliac disease in Italy. The SIGEP Working Group on Latent Coeliac Disease. Italian Society for Paediatric Gastroenterology and Hepatology. Acta Paediatr. 1995 Nov;84(11):1252-7.

Tsitsikov E, Wright DA, Geha RS. CD30 induction of human immunodeficiency virus gene transcription is mediated by TRAF2. 1997. Proc Natl Acad Sci 94:1390]1395

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.

Unidad Europea de Gastroenterologia. Week in Amsterdam, 2001. When is a coeliac a coeliac? Eur J Gastroenterol Hepatol. 2001 Sep;13(9):1123-8.

Vader W, Kooy Y, Van Veelen P, De Ru A, Harris D, Benckhuijsen W, Peña S, Mearin L, Drijfhout JW, Koning F. The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides. Gastroenterology. 2002 Jun;122(7):1729-37.

van de Water Jolanda M.W, Cillessen Saskia A.G.M, Visser Otto J, Verbeek, Wieke

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

H.M, Meijer Chris J.L.M, Mulder Chris J.J. Enteropathy associated T-cell lymphoma and its precursor lesions. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology 24 (2010) 43–56

van Heel DA, West J. Recent advances in coeliac disease. Gut. 2006 Jul;55(7):1037-46.

Ventura A, Magazzu G, Greco L. Duration of exposure to gluten and risk for autoinmune disorders in patients with celiac disease. Gastoenterology 1999, 117: 297-303.

Verbeek WH, Goerres MS, von Blomberg BM, Oudejans JJ, Scholten PE, Hadithi M, Al-Toma A, Schreurs MW, Mulder CJ. Flow cytometric determination of aberrant intra-epithelial lymphocytes predicts T-cell lymphoma development more accurately than T-cell clonality analysis in Refractory Celiac Disease. Clin Immunol. 2008 Jan;126(1):48-56.

Verkarre V, Asnafi V, Lecomte T, Patey Mariaud-de Serre N, Leborgne M, Grosdidier E, Le Bihan C, Macintyre E, Cellier C, Cerf-Bensussan N, Brousse N. Refractory coeliac sprue is a diffuse gastrointestinal disease. Gut. 2003 Feb;52(2):205-11.

Vivas S, Ruiz de Morales JM, Ramos F, Suárez-Vilela D.Alemtuzumab for refractory celiac disease in a patient at risk for enteropathy-associated T-cell lymphoma. N Engl J Med. 2006 Jun 8; 354(23):2514-5.

Wahab PJ, Crusius JB, Meijer JW, Uil JJ, Mulder CJ. Cyclosporin in the treatment of adults with refractory coeliac disease--an open pilot study. Aliment Pharmacol Ther. 2000 Jun;14(6):767-74.

Wahnschaffe U, Ullrich R, Riecken EO, Schulzke JD. Celiac disease-like abnormalities in a subgroup of patients with irritable bowel syndrome. Gastroenterology. 2001 Dec;121(6):1329-38.

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

Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. Annu Rev Immunol. 1999; 17:331-67.

Walter-Smith JA, Schmitz J, Shmerlin DH, Visakorpi JK. Revised criteria for

diagnosis of coeliac disease. Aech. Dis.child 1990; 65:909-11.

Wang HC, Klein JR. .Multiple levels of activation of murine CD8(+) intraepithelial lymphocytes defined by OX40 (CD134) expression: effects on cell-mediated cytotoxicity, IFN-gamma, and IL-10 regulation. J Immunol. 2001 Dec 15;167(12):6717-23

Watts TH.TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. Annu Rev Immunol. 2005;23:23-68.

Weinberg AD, Wegmann KW, Funatake C, Whitham RH. Blocking OX-40/OX-40 ligand interaction in vitro and in vivo leads to decreased T cell function and amelioration of experimental allergic encephalomyelitis. J Immunol. 1999 Feb 1;162(3):1818-26.

Wilkinson PC, Liew FY. Chemoattraction of human blood T lymphocytes by interleukin-15. J Exp Med. 1995 Mar 1;181 (3):1255-9.

Withers DR, Jaensson E, Gaspal F, McConnell FM, Eksteen B, Anderson G, Agace WW, Lane PJ. The survival of memory CD4+ T cells within the gut lamina propria requires OX40 and CD30 signals. J Immunol. 2009 Oct 15;183(8):5079-84. Epub 2009 Sep 28.

Xue HH, Kovanen PE, Pise-Masison CA, Berg M, Radovich MF, Brady JN, Leonard WJ. IL-2 negatively regulates IL-7 receptor alpha chain expression in activated T lymphocytes. Proc Natl Acad Sci USA. 2002 Oct 15; 99(21):13759-64.

Yoshioka T, Nakajima A, Akiba H, Ishiwata T, Asano G, Yoshino S, Yagita H, Okumura K. Contribution of OX40/OX40 ligand interaction to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Eur J Immunol. 2000 Oct;30(10):2815-23.

Zhang X, Sun S, Hwang I, Tough DF, Sprent J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD81 T cells in vivo by IL-15. Immunity.1998; 8: 591-9.

Zheng B, Fiumara P, Li YV, Georgakis G, Snell V, Younes M, Vauthey JN, Carbone A, Younes A: MEK/ERK pathway is aberrantly active in Hodgkin disease: a signaling pathway shared by CD30, CD40, and RANK that regulates cell proliferation and survival. Blood. 2003, 102:1019-1027.

Zimmer KP, Fischer I, Mothes T, Weissen-Plenz G, Schmitz M, Wieser H, Büning J, Lerch MM, Ciclitira PC, Weber P, Naim HY. Endocytotic segregation of gliadin peptide 31-

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

49 in enterocytes. Gut. 2010 Mar;59(3):300-10.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes