

UCh-Fc
Biotecnología
C196
C.1



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**Papel de los miofibroblastos y sus mediadores inflamatorios en la lesión
intestinal de la enfermedad celíaca**

Memoria de Título

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

por

Juan Francisco Calderón Giadrosic

Septiembre 2005

Santiago - Chile

Director de Memoria de Título:

Dr Oscar Brunser T.
Dra Sandra Verbeke P.

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



**“PAPEL DE LOS MIOFIBROBLASTOS Y SUS MEDIADORES
INFLAMATORIOS EN LA LESION INTESTINAL DE LA
ENFERMEDAD CELIACA”**

Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en
cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular.

JUAN FRANCISCO CALDERON GIADROSIC

Directores de Memoria de Título

Dr. Oscar Brunser Tesarschu

Firma manuscrita en azul de Oscar Brunser Tesarschu sobre una línea horizontal.

Dra. Sandra Verbeke Palma

Una línea horizontal para la firma de Sandra Verbeke Palma.

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dra. María Rosa Bono Merino
Presidente Comisión

Firma manuscrita en azul de Dra. María Rosa Bono Merino sobre una línea horizontal.

Dr. Mario Roseblatt Silber
Corrector

Firma manuscrita en azul de Dr. Mario Roseblatt Silber sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, _____ 2005



Dedico este trabajo a mis padres y hermanos, y a todos aquellos que comparten mis ideales, ilusiones y esperanzas.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todos quienes me han acompañado en este caminar lleno de momentos buenos y algunos de los otros.

En primer lugar, a mi familia, comenzando por mis padres Susana y Ernesto, porque me han acompañado desde siempre en la vida, enseñándome eso que precisamente no se aprende ni en una sala de clases ni en un laboratorio y que ha sido fundamental para ser el que soy. Gracias también a Nedy, por el cariño entregado incondicionalmente a lo largo de todos estos años.

A mi abuelo Ricardo, por ser el gran mentor en mi vida y la persona que me enseñó que en la vida uno debe tratar de dejar el mundo mejor que como se recibió.

A mis hermanos Evelyn, Nedy, Tiare y Maximiliano, porque han sido, son y serán compañeros, amigos y causantes de innumerables momentos de felicidad. Los quiero mucho.

A Ana María, compañera incansable de los últimos dos años. Sin ti flaquita mía, todo hubiera sido más difícil. Gracias por compartir este proyecto de mi vida y por quererme como me quieres. Te quiero yo a ti.

Al laboratorio de Gastroenterología del INTA. Este lugar fue mi segundo hogar durante los últimos dos años y medio y estoy profundamente agradecido de haber llegado acá. Me acogieron como un hijo al que ayudaron a crecer personal y académicamente. Quisiera agradecer especialmente al Dr Oscar Brunser y a Sandra Verbeke, mis tutores. Al Dr Brunser porque no sólo circunscribió su trabajo a aspectos técnicos sino que extendió su guía a aspectos más complejos de la vida y adornó nuestras

discusiones con sabrosas historias e innumerables anécdotas que hicieron de este pasar algo inolvidable.

A Sandra, "la jefa", porque me enseñó a trabajar con tesón y sin claudicar en los momentos difíciles y porque fue el cable a tierra que a veces se me hizo tan necesario en el trabajo.

No quiero dejar de mencionar a Martín Gotteland y a la Dra Cruchet por su apoyo y amistad entregada en este tiempo. A Julia Abatte, "la madre", porque con su estilo inolvidable me retó, me arrulló, me animó y me apoyó todo lo necesario para llegar hasta acá. A Patito Ortiz y Daniel Trincado, porque su ayuda, su amistad y sus "limonadas para el resfrío" también fueron parte importante en mi estadía. Por último a todos mis compañeros de mesón que pasaron por esta unidad junto conmigo: Daniel, Felipe, Sergio, Yael, Sandra, María José... gracias por su cariño y apoyo. Gracias a toda la unidad por aguantar mis risas, mis alegrías y mis rabias...y seguir siendo así conmigo.

A mis "hermanos de la vida". Esos que no sé por qué tenemos apellido distinto. Hernán, Sergio, Claudio, Diego. Gracias por creer en mí. Gracias por hacerme creer en mí cuando la lluvia arreciaba en la vida, y por compartir esos momentos álgidos que nos hicieron más fuertes en el camino.

A mis amigos de la infancia Augusto, Maxi, Pablo, René. A todos mis amigos y camaradas de ideales de la Tercera, porque me acogieron como uno más y me han apoyado en este proyecto de una manera invaluable. A mis compañeros y amigos de la Universidad, Patricio (Spencer y Retamales), Claudia, Dony, Cristián, Mahina y tantos otros. Gracias por compartir y soñar juntos estos años.

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS	vi
INDICE DE TABLAS	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	20
2.1. Pacientes	20
2.2. Obtención "in vitro" de péptidos de gliadina por digestión péptico-tríptica-pancreática (PTP)	21
2.3. Aislamiento y cultivo de miofibroblastos (MF)	24
2.4. Producción de medios condicionados por MF	25
2.5. Actividad de la MMP2 por zimografía	27
2.6. Inmunohistoquímica para MMP1 y MMP3	28
2.7. Detección de MMP3 por enzimoimmunoensayo (ELISA)	29
3. RESULTADOS	31
3.1. Obtención de péptidos de gliadina por digestión (PTP)	31
3.2. Aislamiento, cultivo y subcultivos de MF	35
3.3. Actividad de MMP2	36
3.4. Inmunohistoquímica para MMP1 y MMP3	39
3.5. Detección de MMP3 en cultivos de MF	41
4. DISCUSIÓN	42

5. CONCLUSIONES 49

6. BIBLIOGRAFÍA 51

INDICE DE TABLAS

1. Parámetros de elución para la cromatografía de intercambio **23**
2. Esquema de estimulación de cultivos de MF de individuos normales
y celíacos **26**

INDICE DE FIGURAS

1. Esquema de la unidad cripta – vellosidad	3
2. Mucosa de intestino delgado humano. Cortes histológicos de biopsias duodenales de pacientes celíacos y controles	8
3. SDS – PAGE: seguimiento del desarrollo de la digestión enzimática de gliadina cruda	31
4. Determinación del volumen muerto (V_0), cromatografía de exclusión molecular	32
5. Determinación de volúmenes y relaciones de elución, cromatografía de exclusión molecular	33
6. Determinación de los grupos de péptidos separados por cromatografía de exclusión molecular	34
7. Separación de péptidos de gliadina obtenidos por digestión PTP, cromatografía de intercambio iónico	34
8. Aislamiento de miofibroblastos a partir de mucosa intestinal obtenida por biopsia endoscópica (40x)	35
9. Subcultivo: miofibroblastos de mucosa intestinal, 70 - 80 % de confluencia (40x)	35
10. Zimografías en geles de acrilamida–gelatina: actividad de MMP2 a partir de medios condicionados por miofibroblastos de pacientes celíacos y controles, basal y con estímulo	36
11. Gráfico comparativo de la actividad de MMP2 con estímulos de citoquinas en distintas concentraciones	37
12. Gráfico comparativo del efecto de citoquinas en la actividad de MMP2 en pacientes celíacos y controles	38
13. Gráfico de actividad de MMP2 de pacientes celíacos y controles con distintos estímulos pro-inflamatorios y de gliadina	39
14. Inmunohistoquímica para MMP1 en celíacos y controles (40x)	40
15. Inmunohistoquímica para MMP3 en celíacos y controles (40x)	40
16. Concentración de MMP3 en medios condicionados por MF	41

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Célula presentadora de antígenos
BALT	Tejido linfoide asociado a tejido bronquial
BSA	Albúmina de suero bovino
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
EC	Enfermedad celíaca
EDTA	Ácido etilen – diamin – tetraacético
GALT	Tejido linfoide asociado a intestino
IEL	Linfocito intraepitelial
IFN - γ	Interferón gamma
IGF	Factor de crecimiento de tipo insulínico
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
MEC	Matriz extracelular
MF	Miofibroblasto
MHC	Molécula de histocompatibilidad
MMP	Metaloproteinasa de matriz
NALT	Tejido linfoide asociado a tracto nasal
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteinasa de matriz
TMB	Tetrametil benzidina
TNF - α	Factor de necrosis tumoral alfa
tTG	Transglutaminasa de origen tisular

Técnicas

Digestión PTP digestión péptico – trípica – pancreática

ELISA Enzimo inmuno ensayo

PAGE electroforésis en gel de poliacrilamida

Resumen

La enfermedad celíaca es una patología de base inmune desencadenada por la ingestión de la gliadina –uno de los componentes proteicos del gluten- en sujetos genéticamente susceptibles.

Los antígenos que alcanzan el corion de la mucosa intestinal entran en contacto con un sistema inmune capaz de montar respuestas adecuadas a las propiedades del antígeno. Este sistema debe tener la capacidad de distinguir entre aquellas situaciones en las que no es necesario montar una respuesta inmune (tolerancia oral) y aquellas en las que el sistema inmune del organismo debe reaccionar.

En el caso de la enfermedad celíaca, los fragmentos peptídicos de la gliadina, al ser desamidados por la tTG (transglutaminasa de origen tisular) quedan unidos a su sitio activo, generando un nuevo epítotope que es reconocido por el organismo como un antígeno, el que es presentado a las células T dando lugar a una respuesta inmune que desencadena el proceso patológico.

El daño en la EC presenta es más intenso en la mucosa intestinal de la porción duodeno-yeyunal, aquí se produce un daño que se caracteriza por la desaparición de las vellosidades, resultando una mucosa con superficie plana cuyas criptas alcanzan el lumen intestinal (hiperplasia), intenso daño de los enterocitos e infiltración del corion por linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos. Estas alteraciones histológicas son el sustrato morfológico para la malabsorción de nutrientes que alcanza diversas magnitudes y depende de la duración de la exposición al gluten y de características propias del paciente, pudiendo en algunos casos provocar su desnutrición y síntomas de deficiencias nutricionales específicas.

Como parte de la complejidad de la mucosa intestinal, se distinguen varios tipos celulares característicos. Los enterocitos o células epiteliales están encargados de las funciones de absorción y se distribuyen en unidades estructurales compuestas por vellosidades y criptas; el tejido conectivo de la mucosa, está ubicado por debajo de esta monocapa de enterocitos a la que presta soporte mecánico, vascularización e inmunidad. En la base de la mucosa se ubica la *muscularis mucosae* que la separa de la submucosa.

En la unión del epitelio y el tejido conectivo del corion existe una población de células estrelladas, los miofibroblastos (MF). Estos cumplen funciones paracrinas relacionadas con la síntesis y secreción de factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas, que regulan su propio crecimiento y diferenciación, así como el de otros tipos celulares. A través de la secreción de estas moléculas los MF modulan funciones y contribuyen a la organización de los componentes de las unidades cripta - vellosidad regulando la homeostasis del epitelio intestinal, y a través de él, de todo el organismo.

Se estudió el comportamiento *in vitro* de poblaciones de MF cultivadas a partir de biopsias intestinales obtenidas por endoscopia de individuos con EC y se lo comparó con los MF de individuos controles en lo referente a la expresión y actividad de moléculas involucradas en el proceso de remodelación de la membrana basal. Específicamente, este estudio se enfocó sobre 3 proteínas de la familia de las metaloproteinasas degradadoras de matriz (MMPs): MMP1, MMP2 y MMP3. Esto debido a que se tenía conocimiento del efecto de estas tres moléculas sobre los principales componentes de la matriz del tejido conectivo de la mucosa (colágeno, laminina, fibronectina, entre otros).

La expresión de MMP1 y MMP3 fue estudiada mediante métodos inmunohistoquímicos en cortes histológicos de mucosa intestinal. Para ambas metaloproteinasas se observó

una sobreexpresión en los pacientes con EC en comparación con los controles. La secreción de MMP3 en cultivos de MF fue cuantificada mediante la técnica de ELISA en medios condicionados obtenidos de los cultivos de MF de pacientes y controles.

Respecto de MMP2, se observó que en condiciones basales, los medios condicionados obtenidos a partir de cultivos de MF de pacientes con EC mostraron una actividad enzimática de gelatinasa significativamente mayor que los MF obtenidos a partir de controles. Esta tendencia se repite en el caso de los cultivos estimulados con TNF- α , IFN- γ y péptidos de gliadina; sin embargo, esta diferencia no fue tan pronunciada ya que el alto nivel de actividad MMP2 mostrado por MF de los controles sometidos a estímulos se acerca mucho al de los pacientes celíacos.

A partir de los resultados obtenidos, inferimos que el sistema MMP de la mucosa intestinal de pacientes con EC estaría alterado significativamente, resultando en una mayor degradación de la matriz y colaborando en la desorganización de la arquitectura normal de la mucosa intestinal.

En este contexto, esta investigación es una aproximación para explicar el papel de los MF subepiteliales de la mucosa intestinal en el desarrollo de la lesión histológica de la EC. El enfoque experimental utilizado nos permitió inferir que ciertas propiedades de los MF estarían alteradas en esta enfermedad. Específicamente, este tipo celular tendría su patrón de actividad y/o expresión de MMPs desregulado en la EC, tanto en condiciones basales como al responder a estímulos con citoquinas proinflamatorias, de tal manera que provoca un desequilibrio en el recambio de la matriz extracelular que llevaría a la transformación de la arquitectura de la mucosa.

Abstract

Celiac disease is an immune-based pathology triggered by the ingestion of gliadin (one of the main proteins of wheat) in genetically susceptible individuals.

Antigens that reach the lamina propria of the intestinal mucosa come into contact with an immune system capable of generating adequate responses whose quality depends in part on its nature. This system has the capacity to discern between those antigens for which an immune response is not required (oral tolerance) and those for which a response must be produced.

In the specific situation of celiac disease, when peptidic fragments of gliadin, the main protein of wheat, are deamidated by tissue transglutaminase (tTG) they remain attached to the active site of this enzyme and this generates a new epitope that is recognized as an antigen by the organism; in this condition it is presented to T cells, initiating an immune response that results in the pathological process.

In celiac disease the damage is most intense in the mucosa of the duodeno-jejunal loops of the small bowel: it is characterized by effacement of villi and an apparent hyperplasia of crypts, resulting in a flat mucosa with extensive damage to the enterocytes and infiltration of lymphocytes, plasma cells and eosinophiles in the lamina propria. These histological alterations are the morphological substrate for nutrient malabsorption of varying intensity depending on the duration of the exposure to gluten and on the particular, genetic characteristics of the patient. In some critical cases, these celiac patients may become severely malnourished and exhibit signs and symptoms of specific nutrient deficiencies.

As a part of the histological complexity of the intestinal mucosa, several cell types can be identified. The enterocytes or epithelial cells are responsible for the absorption of

nutrients and are distributed in structural units formed by crypts and villi; the connective tissue of the mucosa, beneath the enterocyte monolayer provides mechanical support, vascularization and immunity to the epithelium. In the base of the mucosa the *muscularis mucosae* separates it from the sub-mucosa.

At the junction of the epithelium and the connective tissue of the lamina propria there is a population of stellate cells, the myofibroblasts (MF), which have auto and paracrine functions related to the synthesis and secretion of growth factors, cytokines and chemokines that regulate their own growth and differentiation as well as that of other cell types. By secreting these molecules, MF modulate mucosal functions and contribute to the organization of the components of the villous - crypt unit, regulating intestinal epithelium homeostasis and in consequence, the homeostasis of the whole organism.

The expression and activity of some of the molecules which participate in the remodeling process of the basal membrane of the intestinal mucosa was assessed in MF populations cultured from intestinal biopsies obtained by endoscopy from celiac patients and controls. Specifically, this study focused on three members of the matrix metalloproteinase family (MMPs): MMP1, MMP2 and MMP3. This choice was made on the basis of their effects on the main components of the extracellular matrix of the connective tissue in the intestinal mucosa (collagen, laminin and fibronectin among others).

The expression of MMP1 and MMP3 was assessed by immunohistochemical methods in histological sections of intestinal mucosa. An over-expression of both molecules was observed in celiac patients compared to the controls. Secretion of MMP3 in MF cultures was measured with an ELISA assay on conditioned media obtained from these cultures.

Regarding MMP2 (gelatinase), it was observed that the conditioned media obtained from MF cultures from celiac patients showed a significantly higher level of gelatinase activity than the media obtained from the controls under basal conditions. This pattern was also observed when MF cultures were stimulated with TNF- α , IFN- γ and gliadin peptides. However, the difference between MF from celiac patients and controls was not as marked since the MMP2 activity levels of stimulated MF cultures from controls were already high.

We propose that the function of the MMPs in the intestinal mucosa in celiac patients is significantly altered, resulting in a more intense matrix degradation, and contributing to the alteration of the normal mucosal architecture.

In this context, this study is an approximation to the role of the sub-epithelial myofibroblasts of the small intestinal mucosa in the development of the mucosal lesion in celiac disease. The experimental approach used in this study allowed us to infer that some properties of the MF population become altered in this disease. Specifically, MFs express a pattern of MMPs activity that is miss-regulated in such a way that it provokes a strong disequilibrium in the extracellular matrix turn-over process and is probably a factor in the transformation of the mucosal architecture.

INTRODUCCION

Estructura y fisiología de la mucosa del intestino delgado

El tubo digestivo humano presenta una anatomía, histología y ultraestructura complejas y adaptadas para la absorción de nutrientes, pero también para cumplir otras funciones. La comprensión de la importancia funcional del tracto digestivo, y en especial del intestino delgado, requiere tener en cuenta que éste representa la mayor superficie del organismo que se relaciona con el medio externo, y que su lumen representaría una invaginación de éste hacia el interior del organismo. A la capacidad de digestión-absorción hay que agregar que la suma de las placas linfáticas de Peyer del íleon terminal, los folículos linfáticos solitarios y las células plasmáticas, linfocitos y macrófagos del corion representan el órgano linfático más voluminoso y que la suma de las células del aparato neuroenteroendocrino la transforman en la principal glándula de secreción interna, con sus respectivas funciones. Como el intestino delgado no está compartimentalizado sino que los distintos mecanismos presentes en él interactúan, la digestión de las proteínas de la dieta no sólo resulta en su hidrólisis hasta péptidos y aminoácidos sino que al mismo tiempo este proceso destruye identidades antigénicas y capacidades alérgicas; los mecanismos que contribuyen al mantenimiento de la homeostasis, tales como la integridad de la cubierta epitelial y de sus uniones estrechas (tight junctions) regulan el movimiento de agua y contribuyen a impedir la translocación de bacterias y virus (MacDonald y Monteleone, 2005). La microbiota residente del colon estimula al sistema inmune local y sistémico, pero también fermenta nutrientes no asimilables y recupera parte de su contenido energético, genera ácidos libres de cadena corta y favorece la síntesis de ácido fólico; compite además

con enteropatógenos y sintetiza sustancias con actividad antibiótica. La cubierta de células epiteliales del tubo digestivo "muestra" el contenido del lumen, especialmente a través de sitios especializados en las placas de Peyer generando una respuesta inmune normal (tolerancia) o anormal sin que se conozca con precisión qué inclina dicha respuesta hacia uno u otro tipo (James, 2003). La coordinación de todas estas actividades es extraordinariamente compleja y requiere del concurso de neuronas del sistema nervioso autónomo y de las células neuroenteroendocrinas que estimulan, inhiben o modulan según las diversas y variables necesidades de la fisiología local y del organismo (Badman y Flier, 2005). En resumen, una de las funciones fundamentales del aparato digestivo es servir de barrera selectiva entre el medio externo y el medio interno, entendiéndose por medio externo el lumen del tubo digestivo. Como parte de esta barrera, el tubo digestivo simplifica la estructura química e inmunológica de las moléculas que llegan como parte de los alimentos a través de la digestión, impidiendo la entrada de secuencias con capacidad inmunogénica; sin embargo, no es una barrera absoluta porque muestra constantemente el contenido del lumen para generar y/o mantener respuestas inmunes adecuadas (Alpers, 1994). Esta flexibilidad funcional es necesaria frente a la variabilidad de la cantidad y calidad de las moléculas provenientes de los alimentos y del mundo exterior en general (fármacos, elementos tóxicos del ambiente, moléculas inertes, etc).

Desde el punto de vista histológico, el intestino delgado también es una estructura compleja, formada por diversos tipos de células especializadas. La arquitectura de la mucosa intestinal con pliegues semilunares de la superficie, visibles a simple vista y más numerosos en los segmentos proximales (duodeno y yeyuno) que en el íleon, impide el flujo laminar del contenido y genera turbulencias que maximizan el contacto entre el contenido del lumen y la mucosa.

La mucosa misma, está formada por una monocapa de células epiteliales prismáticas altas y por tejido conectivo. El epitelio se distribuye a su vez en dos compartimientos continuos entre si: las **vellosidades**, formadas por enterocitos maduros, cuya función más evidente es la absorción de nutrientes, y las **criptas de Lieberkühn**, que representan el compartimiento germinativo inmaduro que da origen por división mitótica, migración y diferenciación a las células epiteliales de las vellosidades. Esta arquitectura aumenta entre 7 y 14 veces la superficie del lumen (Madara y Trier, 1994).

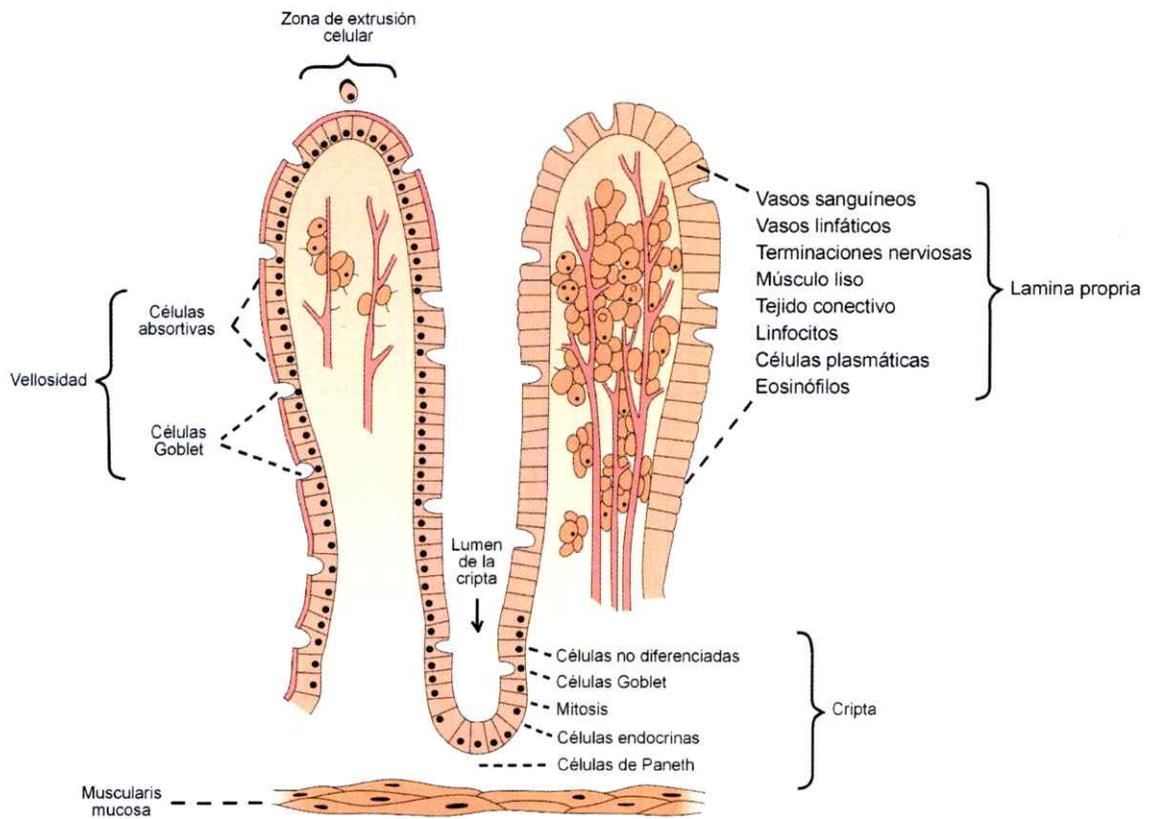


Figura 1. Esquema de la unidad cripta-vellosidad que ilustra la organización histológica de la mucosa del intestino delgado. (Adaptada de Madara & Trier, 1994. Pp 1578)

Por debajo del epitelio se encuentra el corion, un tejido conectivo que presta soporte, irrigación y mecanismos de inmunidad al epitelio intestinal. Separando a la mucosa de

la submucosa hay una capa delgada de tejido muscular liso de 3 a 10 células de espesor denominada *muscularis mucosae*; que participa en la contracción de las vellosidades intestinales que acelera el transporte de los nutrientes absorbidos por los enterocitos hacia los capilares sanguíneos y linfáticos.

Las vellosidades intestinales son prolongaciones digitiformes, de unos 350 - 500 μm de alto, que tienen una cubierta formada por enterocitos y un eje de tejido conectivo, el corion. Los enterocitos forman la monocapa que separa al organismo del medio externo. Las criptas de Lieberkühn son estructuras tubulares, revestidas por células inmaduras con actividad mitótica localizada en su tercio medio y ocho o diez células de Paneth en su fondo (Toner y cols, 1971). Los enterocitos de las vellosidades son prismáticos altos, polarizados en relación con el lumen al que presentan el *ribete estriado*, formado por microvellosidades también digitiformes, de 1 μm de largo, con una ultraestructura filamentosa compleja que tiene capacidad contráctil; a través de su membrana plasmática difunden y/o se transportan activamente los productos de la digestión luminal y de aquella que realizan los enzimas anclados en su espesor (Brunser y Luft, 1970). El citoplasma contiene los organelos clásicos de toda célula, mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso y liso, aparato de Golgi, microcuerpos y un núcleo, de forma ovoide. El núcleo divide al citoplasma en dos regiones: la supranuclear, que está más relacionada con el proceso de digestión y absorción de nutrientes, y la infranuclear con gran cantidad de mitocondrias y elementos del retículo endoplásmico rugoso. Los enterocitos están sometidos a un rápido recambio y su vida media en el adulto sano es de unos cinco días; la extrusión de las células que han cumplido su ciclo se realiza principalmente en el ápice de las vellosidades aunque algunas son eliminadas por apoptosis en sus paredes laterales (Madara y Trier, 1994).

El tejido conectivo de la mucosa intestinal se denomina **corion** o *lamina propria* y constituye el soporte mecánico del epitelio de las vellosidades; forma el eje de cada una de éstas y rodea a las criptas; el corion intercambia con el epitelio nutrientes y otras moléculas funcionalmente activas tales como factores de crecimiento, hormonas y citoquinas entre las cuales podemos mencionar TGF- α , TGF- β , FGF, HGF, somatostatina, secretina, IL-1 y IFN- γ , entre otras (Walsh, 1994; Powell y cols, 1999b). Desde el punto de vista histológico, el corion tiene estructuras estables: miofibroblastos, fibras musculares lisas, vasos sanguíneos y linfáticos, y elementos del sistema nervioso autónomo. Además tiene una población considerable de células con capacidad migratoria que participa en los procesos inmunes de la mucosa intestinal: linfocitos, células plasmáticas, macrófagos y eosinófilos que se encuentran en proporción variable dependiendo del estado funcional (normal vs. patológico) (Madara y Trier, 1994).

La interfase entre el epitelio intestinal y su corion permite no sólo intercambio constante de nutrientes y señales sino también el tránsito de linfocitos, eosinófilos y algunos neutrófilos, hacia los espacios entre los enterocitos; estos últimos envían prolongaciones citoplasmáticas por debajo de la membrana basal y que penetran al corion (Madara y Trier, 1994).

Entre el epitelio y la *lamina propria* existe una población de miofibroblastos (MF), células con capacidad contráctil porque contienen filamentos citoplasmáticos de α -actina, que forman una red inmediatamente por debajo de la membrana basal. Los miofibroblastos tienen forma estrellada en las vellosidades y redondeada en las criptas y sintetizan algunos de los componentes de la membrana basal en forma exclusiva y otros en conjunto con los enterocitos (Powell y cols, 1999a). Los componentes de la

membrana basal no se distribuyen en forma pareja a lo largo del eje cripta-vellosidad sino estableciendo gradientes que probablemente intervienen en la organización de la arquitectura y en la diferenciación normal de la mucosa del intestino delgado. Los MF ejercen funciones paracrinas relacionadas con la síntesis y secreción de factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas que regulan su propio crecimiento y diferenciación y el de otros tipos celulares; esto subraya el papel de estas células en el control de las funciones de los enterocitos, incluyendo su recambio en las vellosidades (Powell y cols, 1999a). Este aspecto será discutido más en detalle en una sección dedicada a este tipo celular.

Durante los primeros años de vida se produce la maduración de la capacidad para digerir y absorber nutrientes del aparato digestivo en relación con el desarrollo de un complejo sistema de enzimas. El proceso de digestión representa una exposición del epitelio intestinal a biomoléculas (proteínas, carbohidratos y lípidos, entre otros) que estimulan el sistema inmunológico y establece la producción de respuestas inmunes normales y el fenómeno de ausencia de respuestas (tolerancia) frente a componentes potencialmente inmunogénicos de la dieta (Dewar y cols, 2003). Las alteraciones de estos procesos pueden desencadenar procesos de intolerancia, alergias alimentarias y otros trastornos que por afectar a un aparato tan importante, derivan en consecuencias para el crecimiento, el desarrollo y el estado nutricional, especialmente durante la infancia e incluso en la edad adulta (Isolauri y Salminen, 2005).

Dado que la enfermedad celíaca representa un verdadero paradigma de las consecuencias de la alteración de todas las funciones y la estructura del tubo digestivo, su estudio permite evaluar las relaciones de cada uno de sus componentes, incluyendo los diversos tipos celulares que componen el epitelio del intestino delgado.

La enfermedad celíaca

La enfermedad celíaca (EC) es una patología con base inmune desencadenada en sujetos susceptibles por la ingestión de gliadina, uno de los componentes proteicos del gluten. La gliadina está presente en el trigo, pero además hay proteínas análogas en otros cereales: la hordeína en la cebada y la secalina en el centeno; respecto de la capacidad de la avena de desencadenar esta enfermedad, el consenso es que probablemente no tiene efectos deletéreos (Green y Jabri, 2003).

La EC tiene un componente genético, aunque éste no está completamente dilucidado. Dado que la mayoría de los pacientes celíacos (90%) son portadores de los haplotipos HLA-DQ2 y HLA-DQ8, la expresión de estas moléculas parecería necesaria para su expresión; sin embargo probablemente participan otros genes, por ejemplo, uno situado en la región 5q31-33 (brazo largo del cromosoma 5), que no está relacionado con los factores HLA, por lo que el desarrollo de la EC no está ligado a un conjunto definido de genes defectuosos (Dewar y cols, 2003).

A pesar de ser desencadenada por un antígeno externo, el gluten de la dieta, la EC presenta rasgos típicos de una patología autoinmune, con aumentos significativos del número de los linfocitos intraepiteliales con el marcador T- $\gamma\delta$, un aumento considerable de los linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos en el corion y con un perfil de citoquinas de tipo Th1 (Stephen, 2003). Como otra manifestación de su carácter autoinmune, la EC muestra una marcada asociación con cuadros de este tipo en órganos lejanos, aspecto que se discute más adelante.

Teniendo en cuenta estas características de la inmunidad en la EC, la búsqueda de métodos de diagnóstico se orientó a la detección de autoantígenos y autoanticuerpos; como resultado se observó una alta producción de anticuerpos anti-endomisio, que reconocen como antígeno a la transglutaminasa tisular (tTG); la prueba de laboratorio

resultante tiene una especificidad diagnóstica de 98 - 100% (Hill y cols, 2005). El hallazgo de estos anticuerpos permite realizar el cribado de poblaciones, orienta el diagnóstico y estimula su confirmación mediante la biopsia peroral o endoscópica y la demostración de la lesión de la mucosa del intestino delgado (Stephen, 2003). El estudio histológico revela una lesión de la mucosa del intestino delgado característica pero inespecífica, con desaparición de las vellosidades, lo que resulta en una mucosa con superficie plana, con criptas que parecen llegar hasta el lumen intestinal, daño intenso de los enterocitos de la superficie e infiltración de la *lamina propria* por numerosos linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos (Trier, 1998). La consecuencia funcional de toda esta alteración es la malabsorción de nutrientes de intensidad variable, que depende en parte de la duración de la exposición al gluten y que causa la depleción de los depósitos del organismo; en sus formas clásicas, la EC remata en la aparición de desnutrición, incluso en adultos (Mearin y Mulder, 1991).

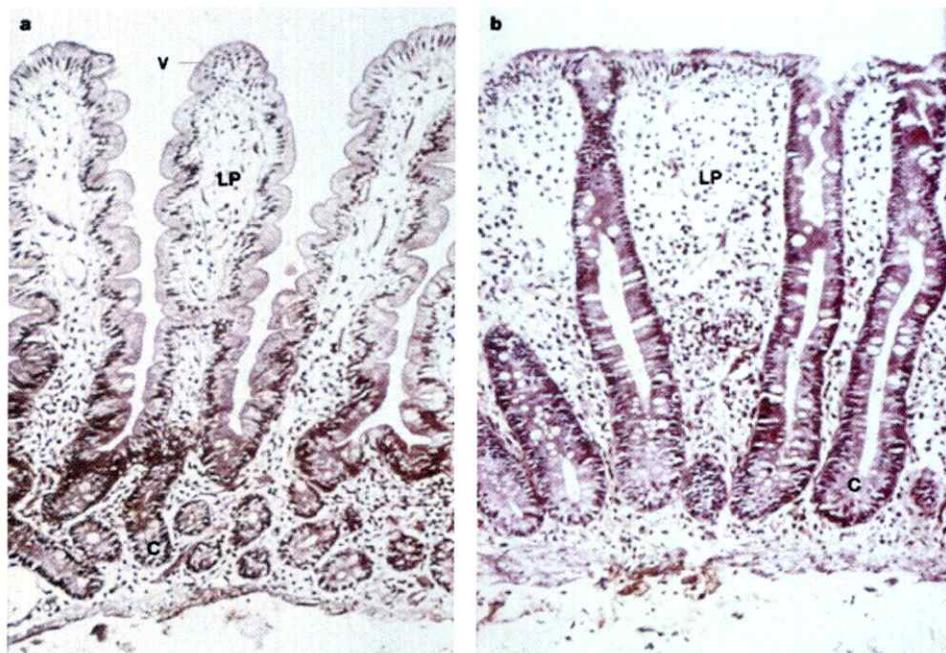


Figura 2. Mucosa de intestino delgado humano. a) Corte histológico de mucosa normal. b) Corte histológico de mucosa de paciente celíaco. (Tomada de Sollid L. Nature Reviews Immunology, Vol 2, Sept 2002)

El cuadro clínico de la EC se comienza a manifestar con la introducción de cereales a la dieta, lo que ocurre generalmente a partir de los 6 meses de edad. Los síntomas más frecuentes son diarrea, pérdida de peso y a veces vómitos, aunque el espectro de la sintomatología es amplio e incluye con el correr del tiempo la detención del crecimiento, baja estatura, retraso del desarrollo puberal, anemia, alteraciones cutáneas y trastornos neurológicos (Polanco y Esteban, 2003).

Aunque la EC ha sido considerada generalmente una enfermedad pediátrica, con una incidencia promedio de 3 casos por cada mil habitantes, el diagnóstico en adultos ha aumentado significativamente, llegando a mostrar tasas cercanas al 7-10 por cada mil habitantes en algunas poblaciones (Jennings y Howdle, 2003). Para el caso puntual de nuestro país, la prevalencia de EC ha sido estimada en 1 caso cada 200 habitantes; como en Chile se producen unos 250.000 nacimientos al año, esto significa que se acumulan 1.000 a 1.200 enfermos todos los años, pero la cifra de diagnosticados es de aproximadamente 100 (Brunser O, comunicación personal). Esto coincide con cálculos en otros países según los cuales sólo uno de cada diez casos de EC es diagnosticado mientras que el 90% restante, si consulta, lo hace muchas veces por cuadros vagos o son reconocidos en forma tardía. En los adultos, los síntomas más frecuentes incluyen, además de la pérdida de peso y episodios recurrentes de diarrea crónica, abortos espontáneos, infertilidad, anemia persistente, osteopenia y osteomalacia, depresión y tumores malignos del tracto digestivo entre otros (Verbeke, 2000) (Ludvigsson y cols, 2005).

Existen además patologías asociadas cuya prevalencia es alta en los pacientes con EC en comparación con la población general: dermatitis herpetiforme, diabetes mellitus tipo I y tiroiditis y hepatitis autoinmunes. La asociación de estas enfermedades

con la EC podría estar directamente relacionada con la duración de la exposición al gluten, lo que subraya la importancia del diagnóstico oportuno y del mantenimiento de una dieta libre de gluten por el resto de la vida (Ventura y cols, 1999; Toscano y cols, 2000)

El sistema inmune de la mucosa intestinal y la enfermedad celíaca

El sistema inmune de las mucosas debe responder adecuadamente a los estímulos potencialmente antigénicos que ingresan al organismo; como se ha manifestado anteriormente el tubo digestivo es la superficie más extensa en contacto con el medio externo y funciona como una barrera muy eficiente frente a microorganismos, nutrientes y cualquier antígeno del exterior. Para mantener la integridad de la mucosa intestinal, el sistema inmune utiliza dos tipos de respuestas: una **innata** o inespecífica y la otra **adaptativa** o antígeno-específica (Maiuri y cols, 2003).

En el primer tipo participan elementos que eliminan de manera general y sin tener en cuenta su identidad o especificidad a los elementos foráneos, sean macromoléculas, virus, bacterias o parásitos. Entre estos mecanismos innatos se encuentran la secreción de mucinas, el glicocáliz del ribete estriado, la membrana plasmática de las microvellosidades y el complejo de unión de los enterocitos (tight junctions) que forman una barrera física entre la monocapa de enterocitos y el lumen intestinal. Las sales biliares son detergentes que actúan sobre lípidos, denaturan moléculas o impiden su adherencia a las membranas celulares. Por otra parte, los enzimas proteolíticos pancreáticos y aquellos del ribete estriado y del citoplasma de los enterocitos digieren macromoléculas de los alimentos y de microorganismos que pasan por el tracto intestinal, minimizando así la carga antigénica (Walker, 2002).

En cuanto a los mecanismos adaptativos, el sistema inmune opera a través de dos tipos de procesos:

- **Exclusión inmune**, que involucra anticuerpos secretorios específicos (IgAs e IgMs) que inhiben la colonización de la superficie del tracto intestinal por microorganismos patógenos así como el contacto de los antígenos con la membrana plasmática y penetración a la mucosa. El sistema de IgA secretora (IgAs) es el componente mejor definido de la inmunidad adaptativa; son anticuerpos que interactúan con los respectivos antígenos en la superficie de la mucosa y probablemente también dentro de los enterocitos e incluso en el corion en aquellos casos en que el antígeno logra traspasar la barrera epitelial; esta sería la etapa final de la exclusión inmune. La defensa de las mucosas que proporciona el sistema IgA polimérica/IgA secretora probablemente es más eficiente que el representado por el sistema IgM porque: (i) la IgA llega más fácilmente al receptor de Ig polimérica y es transportada en forma más eficiente al lumen intestinal; (ii) IgAs es particularmente estable y resiste incluso la digestión por los enzimas del lumen intestinal, lo que facilita su participación en el proceso de exclusión inmune y, (iii) IgAs no estimula la inflamación y puede participar en la eliminación de antígenos solubles presentes en la mucosa (Brandtzaeg, 1995). Por otra parte, es la Ig que el organismo sintetiza en mayor cantidad (3 g por día) (Shanahan, 1994).

- **Tolerancia oral**: toda vez que un antígeno penetra al organismo, el sistema inmune produce una respuesta; después de esta primera respuesta el organismo puede reaccionar de dos maneras: a) mantener dicha respuesta e incluso, incrementarla frente a nuevos contactos con el antígeno o, b) después de la primera respuesta, suprimir las respuestas subsiguientes. Este fenómeno impide que el organismo esté montando continuamente respuestas inmunes frente a moléculas que

no tienen capacidad antigénica o que no tienen efectos nocivos, y evita la posibilidad de errores que generen reacciones de hipersensibilidad hacia sustancias inocuas. Este fenómeno se denomina **tolerancia oral** y es de gran importancia en el funcionamiento del sistema inmune del tubo digestivo (Murch, 2004). Durante la inducción de este proceso hay una importante reducción de la respuesta normal Th1 (celular) más que de Th2 (anticuerpos). Hay tres mecanismos que desencadenan este fenómeno: la **supresión**, en que bajas dosis de antígeno suministradas por vía oral inducirían la secreción de citoquinas (principalmente TGF- β) por parte de un subtipo *Th3* de células T especializadas en regular la respuesta inmune frente a antígenos propios. Los otros dos mecanismos de desarrollo de tolerancia oral se dan en presencia de altas dosis de antígeno, estos son: la **anergia clonal** donde las poblaciones de células T se encuentran imposibilitadas de secretar IL-2 y proliferar, entrando en una fase de latencia y la **delección clonal** en que tanto las células Th1 como Th2 son eliminadas en el bazo (por apoptosis) después de su activación. (Kraus y cols, 2004).

El sistema efector de estos mecanismos es el tejido linfoide asociado con las mucosas, MALT. De acuerdo con el órgano donde se efectúa esta defensa podemos hablar de GALT, NALT o BALT dependiendo si se refiere a tejido linfoide asociado con el intestino, mucosa nasal o bronquial. (Brandtzaeg, 1998; Walter, 2002)

Cuando los antígenos que ingresan por vía oral alcanzan la *lamina propria* de la mucosa intestinal se encuentran con un aparato inmunológico con la capacidad de montar respuestas. Este tejido debe tener la propiedad de poder generar un reconocimiento efectivo de los antígenos peligrosos y por otra parte decidir cuando producir las señales apropiadas que llevarán a establecer un estado de tolerancia, de manera de no generar respuestas y crear memoria para estímulos benignos, de esta

manera permitir que frente a un nuevo contacto se genere un estado de no respuesta (Murch, 2004).

En el caso de la EC, los fragmentos peptídicos de la gliadina, al ser desamidados por la tTG -un enzima que normalmente actúa en numerosas reacciones en el organismo- quedan unidos a su sitio activo, de manera que se genera un nuevo epítotope que es reconocido por el organismo como un antígeno que es presentado a las células T, lo que da lugar a una respuesta inmune que desencadena el proceso patológico. El resultado es un subtipo de células T sensibles al gluten que guiarán todo el proceso inmune, incluyendo la producción de anticuerpos, el reclutamiento de células inmunes adicionales y la degradación de la matriz extracelular (Dewar y cols, 2003). La sensibilidad al gluten que se observa en esta patología produce un aumento de la reactividad de linfocitos T y B contra los péptidos antigénicos de la gliadina o de sus análogos de la cebada y el centeno (Schuppan, 2000).

En la EC la respuesta inmune es mediada principalmente por linfocitos T, con activación de respuestas tipo Th1 y Th2, aunque con predominio de la primera. La respuesta inmune tipo Th1 es generada por linfocitos T CD4⁺. El mecanismo Th1 se asocia con un perfil de producción de interleuquinas que induce la activación de macrófagos (con liberación de IFN- γ y TNF- α); es decir, la respuesta inmune que se genera es mediada por células (Monteleone y cols, 2001). La respuesta Th2, en cambio, estimula la activación de linfocitos B y aumenta la producción no diferenciada de anticuerpos del isotipo IgA secretor y además la de anticuerpos antígeno-específicos, de los isotipos IgA e IgG (Schuppan, 2000).

A nivel de las mucosas, la respuesta inmune Th2 es activada cuando un antígeno traspasa la barrera epitelial por la vía paracelular. El paso del antígeno es clave para el desarrollo de la EC puesto que una vez que los péptidos de gliadina penetran al *corion* esto hace posible la acción sobre ellos de la tTG. Normalmente la tTG cataliza el enlace lateral entre cadenas peptídicas contiguas (cross-linking) mediante un proceso de desamidación de aminoácidos, especialmente gln y lys, con formación de enlaces entre ellos. Este fenómeno ocurre normalmente en procesos muy importantes en el organismo tales como la coagulación de la sangre, la síntesis de colágeno para la cicatrización, etc (Esposito y cols, 2003). En el caso particular de la EC, al desamidar los residuos de Gln de la gliadina, se genera una avidéz y afinidad mayores por las moléculas del MHC presentes en la membrana de las APCs (antigen presenting cells) (macrófagos y enterocitos, entre otros). Esto probablemente hace que la respuesta generada por las células T activadas sea más intensa y persistente y resulte en una mayor secreción de IFN- γ y TNF- α , las que iniciarán el proceso que daña a los enterocitos. La presentación de antígenos en la superficie de los enterocitos amplifica las respuestas de los linfocitos ya sensibilizados (Farrel y Kelly, 2002).

Clásicamente, la patogenia de la lesión intestinal en la EC ha sido atribuida al sistema inmune adaptativo. Sin embargo, Maiuri y cols. sostienen que la inmunidad innata también estaría involucrada. Estos autores describen en los pacientes con EC asociaciones entre respuestas del sistema inmune innato y la ingesta de gliadina (2003).

El sistema inmune innato provee un reconocimiento temprano a los antígenos llamado también reconocimiento por patrón, en una escala de tiempo en la que la actuación del sistema inmune adaptativo (dependiente de presentación de antígenos por HLA,

estimulación y expansión de céls. T) sería demasiado lenta para evitar una destrucción masiva de tejido. Para el caso de la superficie de la mucosa intestinal, continuamente expuesta a toda clase de potenciales toxinas y/o patógenos, este tipo de inmunidad es muy importante. Un desequilibrio en este sistema generaría reacciones inmunes inapropiadas frente a antígenos dietarios generalmente inocuos. En el caso de la EC, hay autores que postulan que el sistema inmune adaptativo y el innato se estimulan a partir de distintos epítopes de péptidos de gliadina (Matysiak-Budnik y cols, 2003).

Esto explicaría no sólo la activación de linfocitos T como respuesta al estímulo con gliadina (sistema inmune adaptativo) sino también la presencia de una respuesta en base a linfocitos T antígeno-independiente y regulada por IL-15, característica de las respuestas inmunes innatas (Maiuri, 2000). Este patrón de respuesta estaría relacionado con la existencia de zonas no-inmunodominantes e inmunodominantes en la molécula de gliadina, las que activarían a los sistemas inmunes innato y al adaptativo respectivamente. Según estos autores, al estimular cultivos de células del epitelio intestinal de pacientes con EC, se observa que se producen niveles altos de expresión tanto de moléculas típicas de las respuestas innatas (IL-15, p38 MAP kinasa, CD83, COX-2 y CD25 entre otras) como de las respuestas adaptativas (secreción de anticuerpos por linfocitos B y activación de linfocitos T citotóxicos (Catassi y cols, 2002; Maiuri y cols, 2003).

Miofibroblastos y enfermedad celíaca

Los MF son un grupo especial de fibroblastos semejantes morfológicamente a las fibras musculares lisas, que están ampliamente distribuidos en el organismo y se caracterizan por tener apariencia y función similares cualquiera sea el tejido u órgano

en que se encuentren; sin embargo, en un determinado tejido pueden expresar apariencias y funciones específicas, es decir, existiría en ellos un cierto grado de heterogeneidad fenotípica y funcional. Los MF tienden a localizarse en la vecindad de células epiteliales o parenquimatosas; en el intestino delgado están localizados inmediatamente subyacentes a las células epiteliales de las criptas y a los enterocitos, de los que están separados por la membrana basal. Los MF modulan funciones de estas células y contribuyen a la organización de la unidad cripta – vellosidad precisamente a través de la síntesis de proteínas de la membrana basal del epitelio que se distribuyen en gradientes que representan señales específicas para la organización morfológica y funcional de la mucosa. En condiciones normales, los MF tienen también capacidad de regular la proliferación y/o diferenciación de las células epiteliales intestinales; frente a un mismo estímulo y en diferentes segmentos del intestino delgado, serían capaces de generar distintas “calidades de respuesta” histológica y funcional (Powell y cols, 1999 a y b).

Los MF subepiteliales del intestino delgado juegan un papel fundamental en la diferenciación de la unidad cripta-vellosidad; las células epiteliales intestinales cultivadas en forma aislada tienden a formar monocapas, pero en presencia de MF tienden a organizarse en estructuras semejantes a vellosidades si los MF se originaron de vellosidades o en forma de criptas si provenían del nivel de las criptas (Powell y cols, 1999b). Los MF entonces no sólo participan en la dinámica de diferenciación estructural de los tejidos sino que participan también en funciones tales como el control del transporte de electrolitos y por ende, en la homeostasis del epitelio intestinal y de todo el organismo (Sanders y Basson, 2003; Sumiyoshi y cols, 2004).

Las lesiones de la mucosa intestinal en la enfermedad celíaca son más intensas en los segmentos proximales que en los distales y esto ha sido atribuido a las diferentes concentraciones de gluten a lo largo del lumen; sin embargo, también es posible que factores tales como la "calidad" de las moléculas sintetizadas por los MF en distintos segmentos del intestino sea quien realmente module la intensidad y calidad de las respuestas a esta proteína de la dieta (Powell y cols, 1999a).

La síntesis de la membrana basal es un proceso complejo y altamente coordinado a cargo de la diada formada por los MF y las células epiteliales. La secreción de sus principales componentes (colágeno tipo IV, laminina, fibronectina y polímeros de heparán sulfato, principalmente) provee no sólo el soporte estructural necesario para la organización de la arquitectura de la mucosa sino también señales para organizar este proceso (Verbeke y cols, 2002). El endomisio es una lámina delicada de fibras reticulares que rodea a cada una de las fibras del tejido muscular liso y estriado (Gauthier, 1973). En la EC, los anticuerpos antiendomiso pueden interferir en la interacción entre MF y enterocitos, alterando la síntesis y organización de la membrana basal; esto podría estimular la remodelación de la mucosa a través de la producción de MMPs que degradan la membrana basal principalmente como parte de las actividades de los MF y macrófagos (Verbeke y cols, 2002).

Las MMPs son una familia de proteasas presentes en todos los tejidos, compuesta hasta ahora por 28 enzimas distintas, que actúan sobre moléculas filamentosas que forman parte del tejido conectivo. En la mucosa intestinal, las MMPs más importantes son la MMP1 cuyo sustrato, el colágeno tipo I predomina en la matriz; la MMP2, uno de cuyos sustratos es el colágeno tipo IV, y la MMP3 (estromelisin) que degrada laminina, fibronectina, colágeno tipo IV y diversos proteoglicanos. La acción de las

MMPs es regulada a su vez por inhibidores específicos de origen tisular, TIMPs (por sus siglas en inglés, Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases) (Powell y cols, 1999b).

Lo anterior apoya el concepto de que los MF participarían en procesos normales y patológicos del tubo digestivo, incluyendo la EC, y juegan un papel importante en el mantenimiento de la integridad y la función de la mucosa intestinal. Estudios con MF han demostrado que estas células tienen la capacidad de sintetizar citoquinas, quimoquinas, factores de crecimiento y otros mediadores de los procesos inflamatorios, entre los que podemos mencionar IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β , PGE₂, prostaciclina, NO, además de las ya mencionadas MMPs y sus respectivos TIMPs (Powell y cols, 1999b).

Se ha postulado que la localización de las MMPs, liberadas por los MF inmediatamente por debajo del epitelio podría explicar, al menos en parte, el acortamiento de las vellosidades y la elongación de las criptas observadas en la enfermedad celíaca (Heuschkel y cols, 2000). La discusión anterior pone de manifiesto que no hay una explicación clara y satisfactoria para la patogenia de la lesión de la mucosa intestinal en la EC, pero que existen numerosos antecedentes que indican que las células del corion, y especialmente los MF y sus productos, deben jugar un papel importante en este proceso (Daum y cols, 1999). La investigación acerca de la expresión y actividad de las MMPs, de sus características funcionales y de su entorno en la enfermedad celíaca puede contribuir a resolver algunas de las incógnitas en esta enfermedad.

La presente tesis pretende investigar el papel de los MF subepiteliales del intestino delgado en el desarrollo de la lesión en la EC y en la restitución de la arquitectura de la mucosa al eliminar el gluten de la dieta. Para esto, se estudiará el comportamiento *in vitro* de poblaciones de MF de individuos con diagnóstico de EC comparándolos con los de individuos que sirvieron como controles, a través de la expresión de genes

involucrados en la respuesta inflamatoria y en la remodelación de la membrana basal. Dado que la lesión de la EC involucra un cambio drástico de la arquitectura de la mucosa intestinal y lesiones del epitelio es posible suponer que debería haber una expresión anómala de productos de los MF, tales como MMPs y TIMPs; estos, cuya actividad en condiciones normales está en equilibrio, pueden estar alterados en el proceso de reorganización y de regeneración de tejido, favoreciendo el cambio de su organización y alterando la estabilidad de su estructura (papel de las MMPs y de los TIMPs), lo que no estaría ocurriendo de manera normal en los sujetos con EC.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el papel de los miofibroblastos en la patogenia de la lesión intestinal y sus alteraciones funcionales en la enfermedad celíaca.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1- Obtener "in vitro" péptidos de la gliadina por digestión péptico-tríptica

- 2- Caracterizar y comparar el efecto de citoquinas y de péptidos de gliadina adicionados a cultivos de miofibroblastos de pacientes celíacos y controles a través de:
 - a. La actividad de MMP2 y la expresión de MMP1, MMP2 y MMP3.
 - b. La distribución de MMPs a través de inmunohistoquímica

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Pacientes

La población estudiada fueron pacientes que consultaron al Servicio de Gastroenterología del Hospital de Niños Exequiel González Cortés para el estudio de un posible síndrome de malabsorción y sospecha de EC, en el período comprendido entre enero de 2001 y diciembre de 2004. Aquellos individuos en quienes los exámenes de laboratorio y las biopsias de mucosa intestinal descartaron la EC y otras patologías intestinales sirvieron de controles.

Otra fuente de muestras de mucosa intestinal control fue el Servicio de Cirugía del Hospital Clínico de la Universidad de Chile "José Joaquín Aguirre" que proporcionó pequeños trozos de pared del duodeno de pacientes que requerían "by-pass" gastro – duodenales o corrección de malformaciones intestinales.

El protocolo de este estudio fue aceptado tanto por el Comité de Ética del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), de la Universidad de Chile como por los centros de salud citados.

Durante la duración del proyecto FONDECYT que sustentó a la presente tesis se recolectaron un total de 41 muestras de pacientes celíacos y 34 muestras de pacientes controles.

2.2 Obtención "in vitro" de péptidos de gliadina por digestión péptico-tríptica-pancreática (PTP)

- Sefadex G-100 (Sigma, Suecia)
- Sefarosa – sulfopropilo de flujo rápido (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia)
- Gliadina (Sigma, Suecia)
- Columna de vidrio, dimensiones: 1,5 cm diámetro interno x 30 cm alto (Sigma, Saint Louis, Estados Unidos de Norteamérica)
- Colector de fracciones eluidas modelo 2110. (BioRad. California, Estados Unidos de Norteamérica)
- Bomba peristáltica "jimmy, junior cassette pump" (Manostat, Estados Unidos de Norteamérica)

La digestión PTP de la gliadina fue efectuada según Bronstein y cols; 100 g de gliadina fueron digeridos con 2 g de pepsina purificada disuelta en un litro de HCl 0.2 N (pH 1.8) durante 2 horas a 37° C. Del producto de esta digestión se guardaron 10 ml para su análisis posterior. Al producto de la digestión péptica se le agregó 2 g de tripsina purificada ajustando el pH a 8.0 con NaOH 2N, agitando vigorosamente a 37 °C durante 4 horas; nuevamente, una alícuota de 10 ml fue reservada para su análisis.

El producto resultante se trató con 2 g de pancreatina purificada agitando durante 2 horas, manteniendo constante el pH 8.0. Al igual que en los pasos anteriores, 10 ml del producto de esta digestión final fueron conservados para su análisis.

Cromatografía de exclusión molecular

En la primera fase, con el fin de aislar el péptido antigénico buscado, el producto de la digestión PTP fue sometido a cromatografía de exclusión molecular. Para ello se utilizó una columna Sephadex G-100 con un rango de fraccionamiento para proteínas globulares entre 4 kDa y 150 kDa y para dextranos entre 1 kDa y 100 kDa; para preparar la fase estática, 37 g de la resina fueron hidratados durante 2-3 días, hasta obtener un volumen final de 550 ml de cama cromatográfica ($h=93$ cm).

Una vez hidratada y estabilizada la resina se procedió a estimar el volumen muerto V_0 de la columna montada a través de la elución de azul dextrano y la medición de la absorbancia de los eluyentes recolectados a 550 nm; finalmente V_0 fue estimado en 150 ml (ver *resultados*). Una vez determinado V_0 se procedió a realizar una segunda curva de calibración con un grupo de estándares de pesos moleculares conocidos

Los datos de estas dos curvas permitieron determinar el peso molecular de las muestras problemas con un alto grado de certeza. Las proteínas que se utilizaron para la calibración fueron albúmina de suero bovino, (66 kDa); β -lactoglobulina (18.5 kDa) y citocromo C (12.4 kDa).

Las muestras se recolectaron a razón de 30 ml/h en un colector de fracciones de manera de obtener 4 ml de eluyente en cada tubo. La concentración de proteínas fue determinada mediante el método Bradford y se construyó una curva de calibración que permitió obtener el peso molecular de las proteínas a eluir. Posteriormente se procedió a eluir el producto de la digestión PTP y se midió su absorbancia a 595 nm para elegir la fracción en la cual se encontraban los péptidos de interés. Estas fracciones fueron liofilizadas para su utilización posterior.

Cromatografía de intercambio iónico

Los péptidos correspondientes al grupo 2 obtenido por cromatografía de exclusión molecular (Fig 6) fueron resuspendidos y luego separados mediante una cromatografía de intercambio iónico para la cual se utilizó una resina sefarosa – sulfopropilo de flujo rápido según el protocolo establecido por De Ritis y cols.

Se procedió a equilibrar la resina en buffer fosfato sódico 5mM, pH = 3,1 y a depositarla en una columna de 1,5 cm de diámetro y 60 cm de alto. De este volumen total, la resina alcanzó un volumen hidratado igual a 35,34 ml (h = 20 cm aprox). Posteriormente, y utilizando una bomba peristáltica para mantener un flujo constante e ininterrumpido de buffer de equilibrio por al menos 7 días, se mantuvo la columna hasta verificar que el pH de entrada de flujo equiparaba al pH de salida en un valor de pH = 3,1 ($\pm 0,1$ unidades).

Posteriormente el liofilizado del grupo 2 obtenido por cromatografía de exclusión molecular fue resuspendido y mezclado (1,5 g de digerido PTP aproximadamente) en buffer fosfato sódico 5mM, pH = 3,1, a una concentración de 6% p/v y se eluyó en un gradiente de fuerza iónica y pH en el orden que se indica a continuación:

Buffer utilizado	pH	Volumen [ml]
Fosfato, 5 mM	3,1	50
Fosfato, 20mM	5,7	32,5
Fosfato, 20 mM	5,9	32,5
Fosfato, 20 mM	6,1	32,5
Fosfato, 20 mM	6,3	32,5
Fosfato, 20 mM	8	50
Fosfato, 20 mM; NaCl 0,5M	8	90

* La elución se efectuó a una velocidad promedio de 15 – 20 ml / hora.

Tabla 1. Parámetros de elución para la cromatografía de intercambio iónico (sefarosa SP)

Finalmente, se midió la absorbancia de los péptidos a 280 nm y se realizó un gráfico de Abs_{280} en función del volumen eluido. A partir de este gráfico se determinó el grupo de péptidos eluidos que se utilizó para la estimulación de los cultivos de MF. Nos referiremos a dichos péptidos en adelante como "pp-gliadina".

2.3 Aislamiento y cultivo de miofibroblastos (MF)

- EDTA 1mM (Sigma. Saint Louis, Estados Unidos de Norteamérica)
- Ditiotreititol 1% en PBS
- Medio de cultivo DMEM F12 (Gibco. New York, Estados Unidos de Norteamérica)
- Suero fetal bovino, SFB (Gibco. New York. Estados Unidos de Norteamérica)
- Penicilina/Estreptomycin/Anfotericina B en solución (Gibco. New York, Estados Unidos de Norteamérica)

Las muestras de mucosa duodeno-yeyunal, de aproximadamente 2 mg de peso cada una, fueron obtenidas mediante biopsia endoscópica y fueron colocadas inmediatamente en medio de transporte DMEM-F12 a temperatura ambiente hasta su procesamiento. En el mismo procedimiento endoscópico se obtuvieron otras muestras que fueron fijadas en solución de Bouin y procesadas histológicamente para certificar el diagnóstico. A partir de 41 biopsias de pacientes celíacos y 34 de controles se aislaron los MF utilizando la técnica de Mahida y cols, por lo que en condiciones estériles y dentro de los 30 minutos posteriores a la obtención, fueron lavadas dos veces con PBS agitando suavemente y se incubaron durante 10 minutos en PBS - 1% de ditiotreititol para extraer el mucus superficial. Posteriormente, y con el propósito de

eliminar la monocapa de células epiteliales dejando al desnudo la membrana basal, las biopsias fueron incubadas por 30 minutos en EDTA 1mM en una atmósfera controlada a 37°C y con 5% de CO₂; posteriormente el tejido fue lavado 2 veces con PBS, agitando fuertemente para desprender las células epiteliales. Finalmente se colocó cada trozo de tejido en un pocillo de placa de cultivo (12-24 pocillos por placa) que contenía medio DMEM-F12 con 5% de SFB con 1% de una solución de penicilina, estreptomycin y anfotericina B. El tejido fue mantenido en una estufa a 37°C en 5% CO₂ renovando diariamente el medio de cultivo en condiciones estériles. A los 14 - 20 días se comenzó a detectar la migración de MF desde los trozos de tejido.

Dentro de las 4-6 semanas siguientes, una vez alcanzada la confluencia en los pocillos del cultivo primario, se procedió a levantar los MF del pocillo de cultivo mediante incubación por 10 min con una solución de tripsina - EDTA (Gibco, New York, Estados Unidos de Norteamérica) y se los traspasó a botellas de cultivo de 25-75 cm² para subcultivo y utilización en los experimentos correspondientes; otra porción se congeló en nitrógeno líquido con el fin de mantener un stock de estas células.

2.4 Producción de medios condicionados por MF

- Medio de cultivo DMEM - F12 (Gibco. New York, Estados Unidos de Norteamérica)
- Suero fetal bovino, SFB (Gibco. New York, Estados Unidos de Norteamérica)
- Penicilina/Estreptomycin/Anfotericina B en solución (Gibco. New York, Estados Unidos de Norteamérica)
- IFN- γ , TNF- α (SIGMA. Saint Louis, Estados Unidos de Norteamérica)
- péptidos obtenidos de acuerdo con lo detallado en la sección I

Se procedió a cultivar los MF de pacientes celíacos y controles en botellas de cultivo de 25-75 cm² con medio DMEM F-12 5% SFB y 1% penicilina-estreptomina-anfotericina B hasta alcanzar un 75-80% de confluencia. Los cultivos se lavaron dos veces con medio sin SFB y posteriormente se agregó 10 ml de medio de cultivo y las células se incubaron durante 24 horas en el mismo medio, con o sin interferón gama (INF- γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en concentraciones de 10 y 100 ng/ μ l o pp-gliadina, según se muestra en tabla 2.

Los medios condicionados (MC) se filtraron, se dividieron en alícuotas y se conservaron a -80°C hasta su utilización. El número de células en cada botella se determinó por recuento con cámara de Neubauer a fin de expresar los resultados en función de dicho número.

Rótulo Botella	A	B	C	D
MF normal (n = 8)	Basal	100 pg/ μ l TNF- α + 20 ppm de pp-gliadina	100 pg/ μ l IFN γ + 20 ppm de pp-gliadina	100 pg/ μ l TNF- α y IFN- γ + 20 ppm de pp-gliadina
MF celíaco (n = 6)	Basal	100 pg/ μ l TNF- α + 20 ppm de pp-gliadina	100 pg/ μ l IFN γ + 20 ppm de pp-gliadina	100 pg/ μ l TNF- α y IFN- γ + 20 ppm de pp-gliadina

Tabla 2. Esquema de estimulación de los cultivos de MF de individuos normales y celíacos.

2.5 Actividad de la MMP2 por zimografía

- .Acrilamida (Winkler. Alemania)
- N`N` bis – metilen–acrilamida (Sigma. Saint Louis, Estados Unidos de Norteamérica)
- Dodecil sulfato de sodio (Sigma. Japón)
- Gelatina (Sigma. Saint Louis, Estados Unidos de Norteamérica)
- TRIZma base (Sigma. Saint Louis, Estados Unidos de Norteamérica)
- HCl fumante (Merck. Darmstadt, Alemania)
- Azul de Coomasie (Sigma. Saint Louis, Estados Unidos de Norteamérica)

Se evaluó la presencia de MMP2 indirectamente a través de su actividad gelatinasa, cuantificada mediante “zimografía en gelatina”. Para esto se realizó una electroforesis de los medios condicionados por MF de celíacos al momento del diagnóstico y controles en condiciones no reductoras en gel de acrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) en presencia de 1 mg/ml de gelatina. Este gel fue preparado en dos etapas: en la primera se prepara la zona de resolución que consiste en un gel de acrilamida en una concentración de 7.5% y que es la que contiene 1 mg/ml de gelatina. La segunda etapa es la de apilamiento o concentración de las muestras: se ubica en la parte inmediatamente superior a la zona de resolución y consiste en un gel de acrilamida al 4% sin gelatina que cumple la función de concentrar en el mínimo volumen posible el total de la muestra al momento de ingresar al gel de resolución.

La cantidad de muestra sembrada se estandarizó en base a la concentración de proteína/ μ l presente en cada medio condicionado y en todos los casos se inyectó un volumen final de 15 μ l. De manera complementaria, al momento de la recolección de

los medios condicionados, se realizó un conteo de las células en confluencia para cada caso, siendo los valores promedios del orden de 10^6 céls. El gel fue resuelto sometándolo a una carga de 100V y amperaje variable entre 15 a 20 mA durante 60 min. El gel fue lavado dos veces con una solución de Triton X-100 al 2,5% en agua destilada durante 30 min. y a continuación fue incubado durante toda la noche a 37°C en buffer Tris - CaCl_2 25 mM pH 8.5; después fue teñido con azul de Coomassie al 1% en ácido acético/isopropanol/agua durante 60 a 90 min. y finalmente se destiñó con una solución de metanol/ácido acético/agua. Las zonas donde se detectó la actividad enzimática para cada condición se midieron con un micrómetro ocular con graduaciones de 0,1 mm. Adicionalmente, los geles fueron fotografiados para su posterior análisis.

2.6 Inmunohistoquímica para MMP1 y MMP3

- Anticuerpos:
 - ✓ Anti MMP1 humana. (Sigma. Saint Louis, Estados Unidos de Norteamérica)
 - ✓ Anti MMP3 humana. (Sigma. Saint Louis, Estados Unidos de Norteamérica)
 - ✓ Anti cadena gamma conjugado con FITC. (Gibco. New York, Estados Unidos de Norteamérica)
- Microscopio BX40 con sistema de fluorescencia BX-FLA y sistema fotográfico PM20. (Olympus, Japón)

Biopsias de 6 pacientes celíacos obtenidas al momento de diagnóstico y de 4 controles fueron fijadas en formol al 10% en buffer fosfato (pH = 7) con 30% de sacarosa e incluidas en parafina y seccionadas en forma seriada. Los cortes fueron incubados primeramente con anticuerpos específicos para ambas MMPs durante una hora a

temperatura ambiente y posteriormente con un segundo anticuerpo anti cadena gamma conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) durante 30 minutos. La tinción fue efectuada sin conocimiento previo del diagnóstico correspondiente a los enfermos de los cuales provenían las biopsias. Sin embargo hay que hacer notar que la observación al microscopio permite diferenciar fácilmente la arquitectura de la mucosa de los controles respecto de la de los pacientes celíacos. Las preparaciones fueron evaluadas por microscopía de fluorescencia por al menos dos observadores y posteriormente fotografiadas.

2.7 Detección de MMP3 por enzimoimmunoensayo (ELISA)

- Kit ELISA MMP3 assay (OncoGene, San Diego, California, Estados Unidos de Norteamérica) compuesto por:
 - ✓ Pocillos recubiertos de anticuerpo anti MMP3 humana (placas de 96 pocillos, strip individuales)
 - ✓ Estándar liofilizado de MMP3 recombinante humana
 - ✓ Anticuerpo monoclonal biotinilado anti MMP3 humana
 - ✓ Conjugado estreptavidina – peroxidasa
 - ✓ Sustrato cromogénico: tetrametilbenzidina (TMB)
- Espectrofotómetro para placas (Automatizador Triturus, Griffols)

En los medios condicionados obtenidos en la sección IV se cuantificó la presencia de MMP3 mediante un ensayo por ELISA. Brevemente, este consiste en un inmunoensayo enzimático para cuantificar la presencia de MMP3 en muestras

biológicas. Para este propósito, el primer paso fue construir una curva de calibración a partir de estándares de MMP3 recombinante humana en concentraciones conocidas, provistos por el fabricante del kit. Las muestras fueron preparadas centrifugando los medios condicionados a 1000G durante 10 min a 4° C, conservando el sobrenadante. En las placas de 96 pocillos se depositaron 50 µl del anticuerpo detector e inmediatamente 50 µl de cada muestra de sobrenadante por duplicado, incubando las mezclas durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas 3 veces con buffer 1X y se agregó a cada pocillo 100 µl del conjugado estreptavidina - peroxidasa incubando durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se lavó 3 veces la placa con buffer de lavado 1X y posteriormente con agua bidestilada, llenando completamente los pocillos para después escurrirlos suavemente. El último paso consistió en agregar 100 µl del sustrato e incubar en la oscuridad por 30 min, al cabo de los cuales se agregó a cada pocillo 100 µl de una solución 2,5N de H₂SO₄ que detiene la reacción de la peroxidasa. La placa fue leída antes de 30 minutos de agregada la solución de ácido en un espectrofotómetro lector de placas con una longitud de onda de 540 nm.

RESULTADOS

3.1 Obtención *in vitro* de péptidos de gliadina por digestión péptico-trípica - pancreática (PTP)

Los resultados de los procesos utilizados para la obtención de péptidos de gliadina, según protocolo de De Ritis y cols. se describen en las Figuras 3 a 8. La Figura 3 muestra los productos obtenidos en las distintas etapas de la digestión PTP en un gel de SDS - PAGE. Se observa que a medida que se suceden las digestiones con las distintas enzimas utilizadas (pepsina, tripsina y pancreatina), se obtienen fragmentos de diferentes pesos moleculares en un rango cada vez más amplio y a su vez sucesivamente menores (carriles 3 al 5).

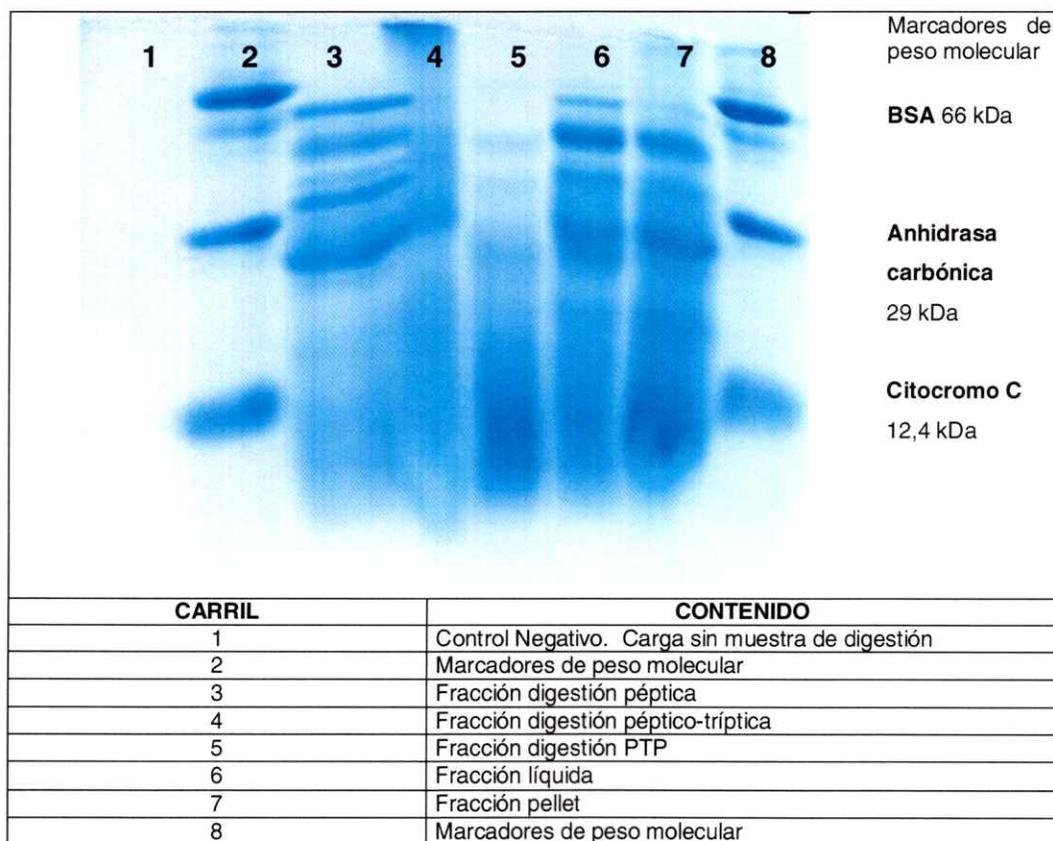


Figura 3. Seguimiento del desarrollo de la digestión enzimática de gliadina cruda en gel SDS - PAGE

Además, en los carriles 6 y 7 de esta Figura se observa que al separar la fracción sólida del sobrenadante, al final de la digestión PTP, no presentan una diferencia significativa en composición proteica, lo que demuestra que el rango de péptidos de peso molecular requerido se conservó a pesar de descartar el material particulado por centrifugación antes de continuar con el procedimiento de separación.

La Figura 4 muestra el resultado de la estimación del volumen muerto (V_0) de la columna de fraccionamiento (Sephadex G-100). Este volumen fue estimado en 150 ml, es decir que para recuperar el total de las muestras desde el inicio de la elución se deben dejar fluir 150 ml, que no contendrán muestras de ningún tipo. Conocer este valor es fundamental para no eliminar ninguna fracción de las muestras a resolver.

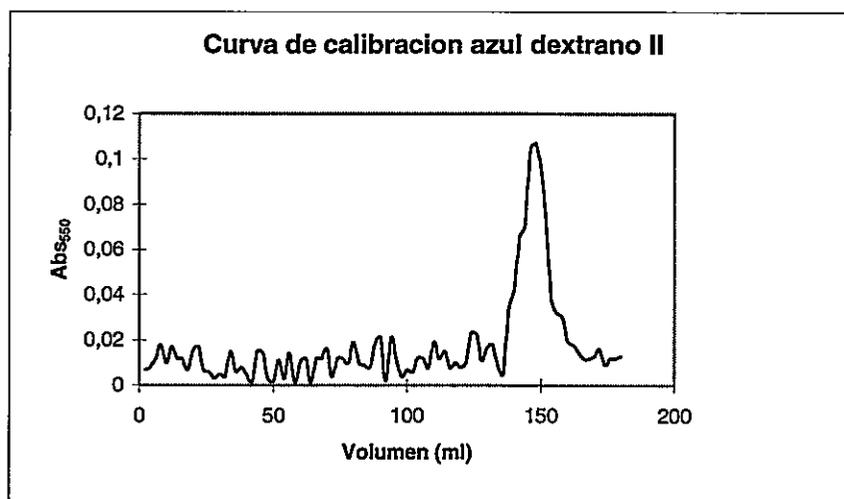


Figura 4. Determinación del volumen muerto (V_0) de la columna de exclusión molecular

Posteriormente fue necesario construir una curva de calibración a través del pasaje y elución de estándares de peso molecular conocido para estimar el volumen de retención correspondiente a las fracciones buscadas. La Figura 5 muestra el patrón de elución de las tres proteínas de peso molecular conocido elegidas para dicha calibración.

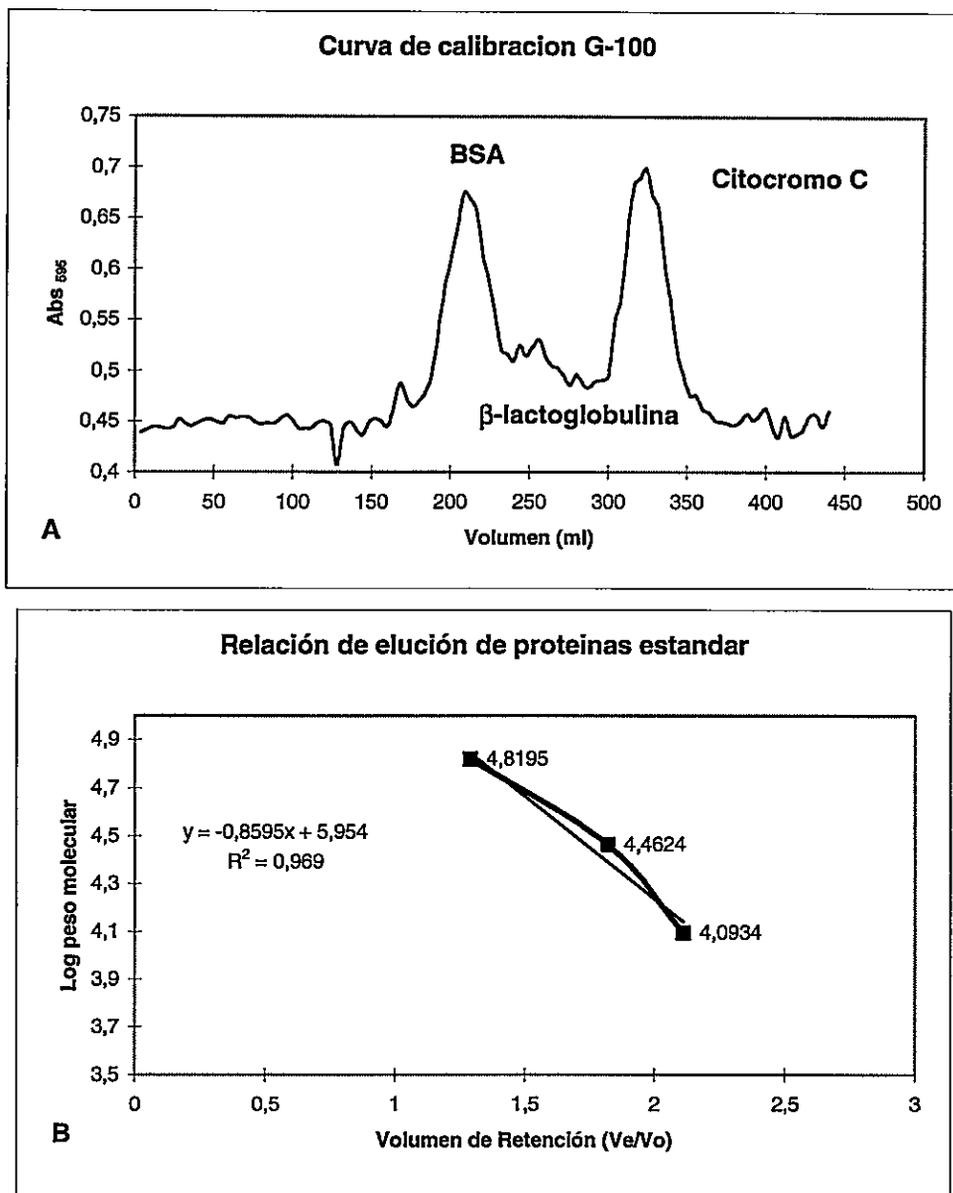


Figura 5. Determinación de volúmenes y relaciones de elución, cromatografía de exclusión molecular. Los volúmenes a los cuales eluyeron las proteínas de peso molecular conocido (fig 5A) dan lugar a la relación de elución mostrada en la fig 5B

Para nuestro objetivo, los péptidos buscados eluyeron con posterioridad al citocromo c y fueron congelados y liofilizados hasta el procedimiento de separación por cromatografía de intercambio iónico. Estos péptidos corresponden a la zona 2 indicada en la Figura 6, es decir con un V_0/V_e entre 1 y 1,5.

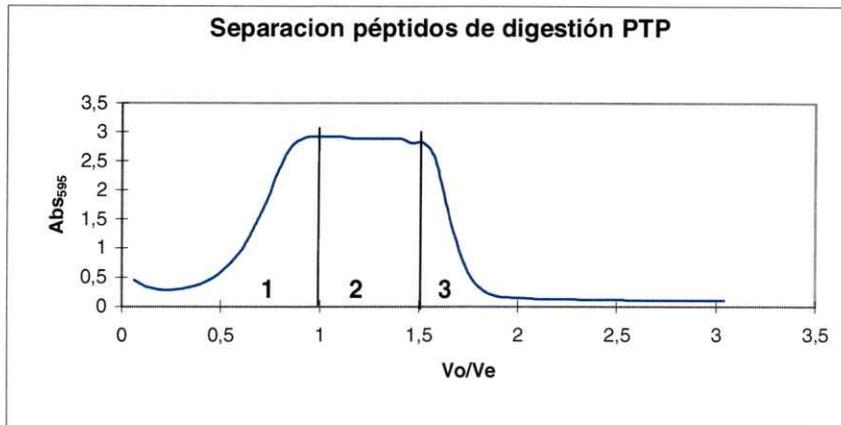


Figura 6. Determinación de los grupos de péptidos separados por cromatografía de exclusión molecular

Finalmente, se procedió a separar los fragmentos obtenidos en el paso anterior a través de una cromatografía de intercambio iónico; como muestra la Figura 7, se obtuvo un perfil de elución muy similar al observado en la literatura (De Ritis y cols). Los péptidos se clasificaron en 5 grupos de acuerdo con el volumen de elución y cada 20 tubos aproximadamente. Para desarrollar los experimentos posteriores, y por contener los péptidos con mayor capacidad antigénica, se eligió el grupo E en concordancia con los trabajos ya descritos (Frazer y cols, 1959).

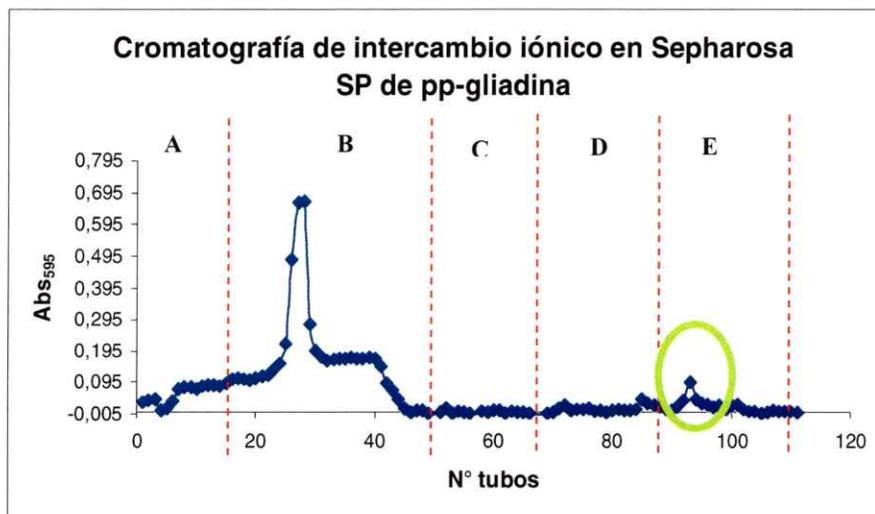


Figura 7. Separación de los pp-gliadina obtenidos por digestión PTP, cromatografía de intercambio iónico

3.2 Aislamiento, cultivo y subcultivos de miofibroblastos (MF)

A partir de las biopsias de pacientes diagnosticados celíacos y de los controles, se lograron aislar y subcultivar 15 y 17 líneas de MF de mucosa intestinal, respectivamente.

Las fotografías expuestas más abajo muestran MF en las distintas etapas de su crecimiento: el cultivo primario a partir de la biopsia (Fig 8) y los subcultivos (Fig. 9).

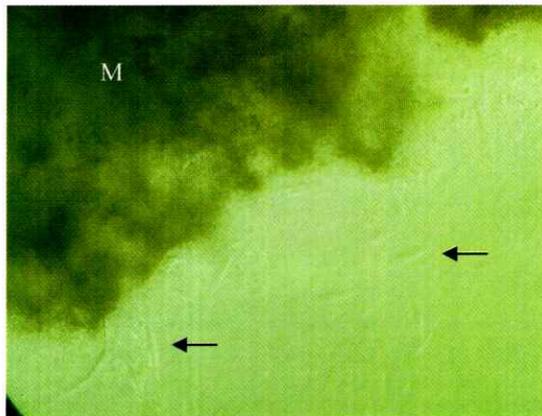


Figura 8. Aislamiento de MF a partir de mucosa intestinal obtenida por biopsia endoscópica. El ángulo superior izquierdo muestra el trozo de mucosa intestinal (M) en cultivo con los primeros MF (flechas) que comienzan a migrar radialmente desde el tejido. (40x)

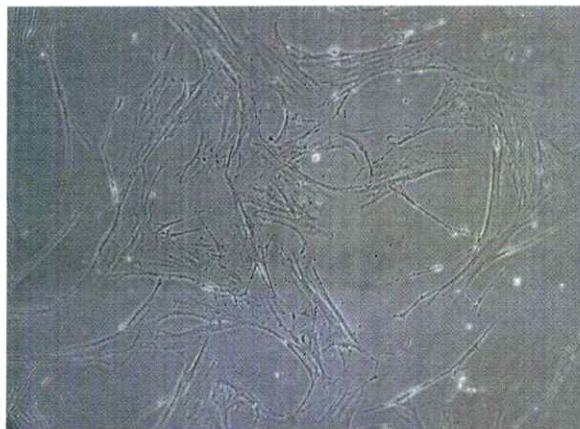


Figura 9. Subcultivo: miofibroblastos de mucosa intestinal, 70-80% de confluencia. La fotografía muestra MF inmediatamente antes de ser estimulados o tripsinizados para su propagación. (40x)

3.3 Actividad de MMP2

A través de la técnica de zimografía en geles de acrilamida-gelatina se pudo semi-cuantificar la actividad de MMP2 (gelatinasa) en medios condicionados por MF como una manera de analizar la concentración de MMP2 producida y liberada por MF de enfermos celíacos en comparación con los controles.

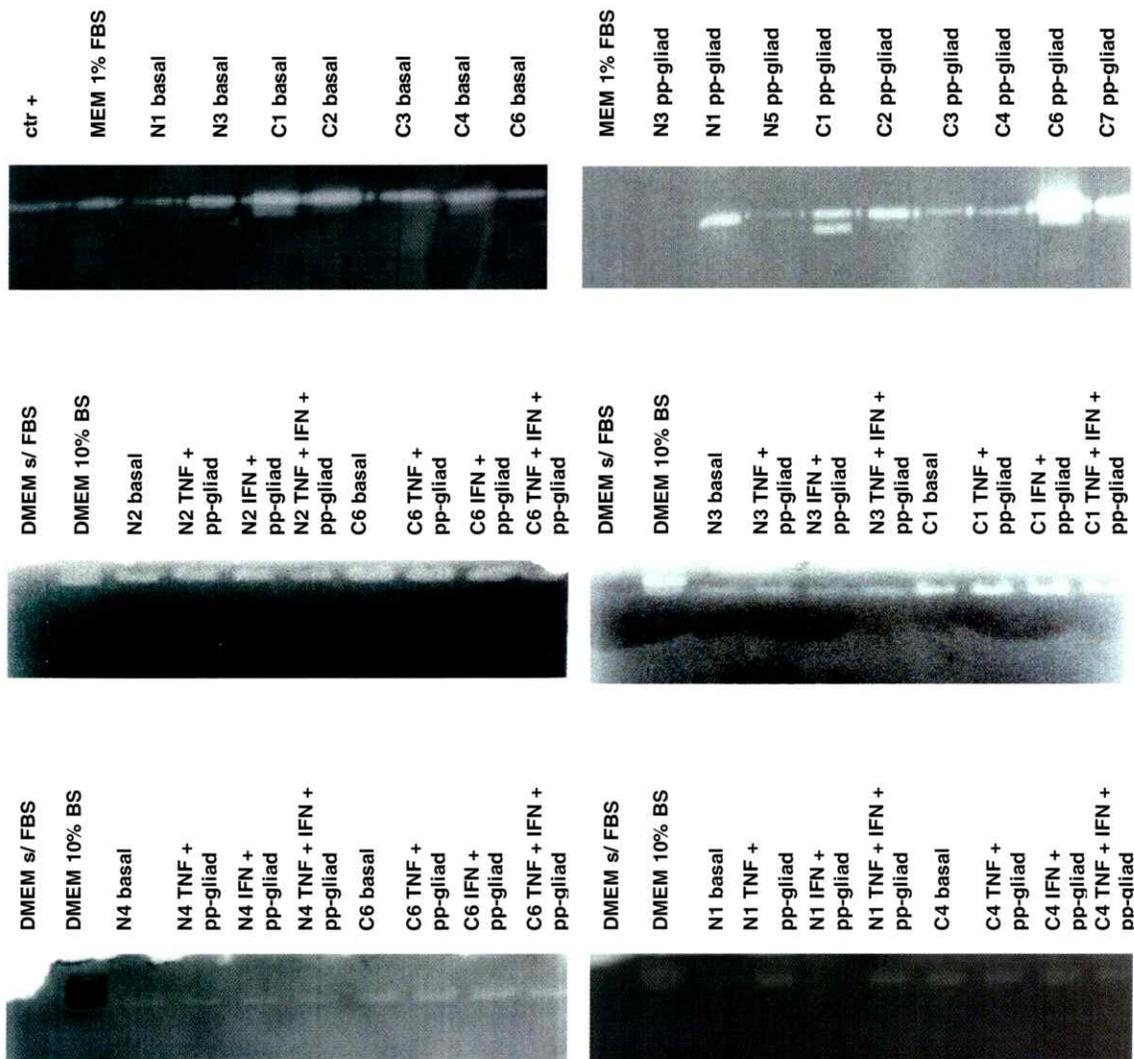


Figura 10. Zimografías en geles de acrilamida-gelatina: actividad de MMP2 a partir de medios condicionados por miofibroblastos de pacientes celíacos y controles, basal y con estímulo

En la Figura 10 se observa que los carriles correspondientes a medios condicionados por MF de pacientes celíacos, tanto de la Fig. A como de la Fig. B, presentan una mayor área digerida por la MMP2 en comparación con la actividad de MMP2 en los medios condicionados de pacientes normales; esto significa que en los pacientes celíacos esta MMP presentaría una mayor actividad que en los controles.

Del mismo modo, en las figuras C, D, E y F se observa una tendencia al aumento en la actividad de MMP2 en los cultivos de MF de pacientes celíacos comparados con los de pacientes controles cuando se les somete a los estímulos de TNF- α e IFN- γ antes mencionados.

En la Figura 11 se observa que, en promedio, los cultivos de MF de pacientes celíacos presentan una actividad significativamente mayor de MMP2. Cuando se recolectó el medio condicionado de cultivos sin estimular, luego de 24 horas de incubación, la diferencia de actividad fue significativamente más marcada respecto a los controles. Las columnas 3-4 y 5-6 muestran el aumento de actividad de la MMP2, a través del aumento del área de digestión sobre gelatina, cuando los cultivos de MF de celíacos fueron estimulados con IFN- γ y TNF- α , en relación a los controles basales.

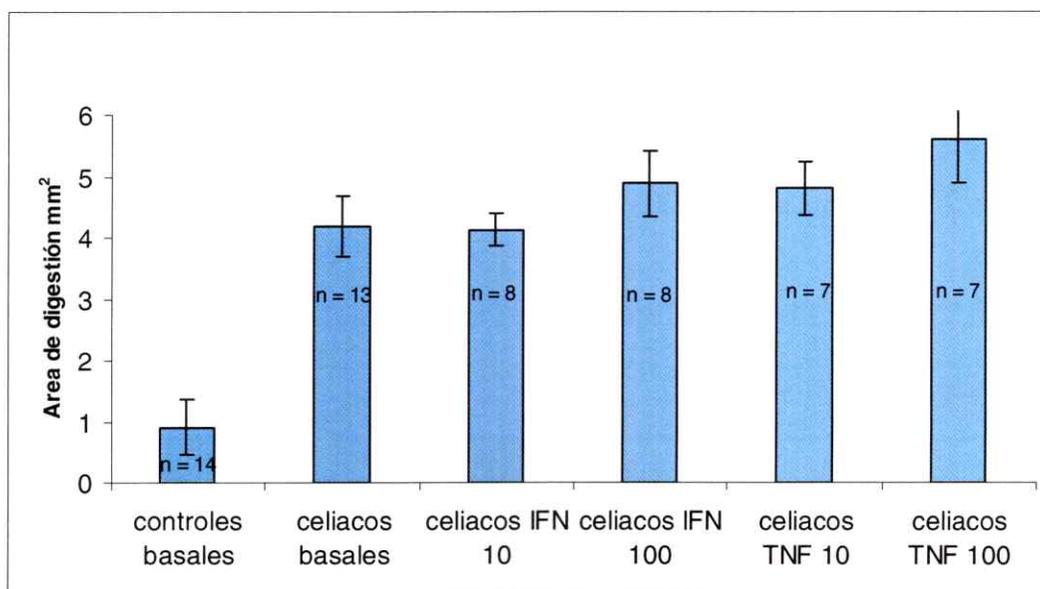


Figura 11. Gráfico comparativo de la actividad de MMP2 con estímulos de citoquinas a distintas concentraciones. La concentración final en el medio de cultivo de cada citoquina (pg/ μ L) está indicada en la Figura bajo la sigla de la citoquina correspondiente.

En la figura 12 se observa que los medios condicionados de MF de pacientes celíacos mostraron una actividad mayor de MMP2 que la de normales a nivel basal, arrojando una diferencia significativa ($p < 0.043$). Respecto a los cultivos de MF estimulados con TNF + pp-gliadina, ambos grupos mostraron un aumento notorio en la actividad de MMP2 al ser estimulados con esta citoquina. Sin embargo, a pesar de no mostrar una diferencia significativa, se observa una tendencia de mayor respuesta al estímulo en el grupo celíaco.

En el caso de los cultivos estimulados con IFN + pp-gliadina se observa una diferencia significativa ($p < 0.043$) en la actividad de MMP2 de celíacos estimulados respecto a la de individuos normales sometidos al mismo estímulo.

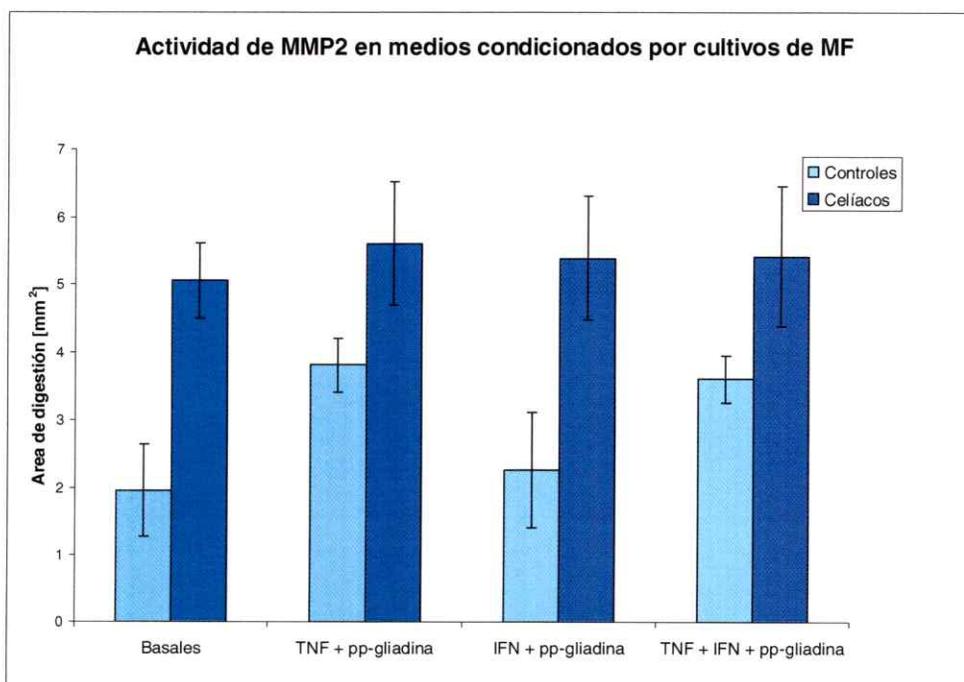


Figura 12. Gráfico comparativo del efecto de citoquinas en la actividad de MMP2 en pacientes celíacos y controles. Las concentraciones de TNF y de IFN son 100 pg/ul. [pp-gliadina] = 20 ppm

Al estimular los dos grupos con ambas citoquinas + pp-gliadina en distintas combinaciones, nuevamente los pacientes con EC muestran niveles más altos de actividad MMP2 que los normales. Nuevamente se observa que, bajo el efecto de cualquier estímulo de los estudiados en el presente trabajo, los individuos con EC muestran una constante tendencia a mostrar niveles superiores de actividad MMP2 respecto a los normales (fig. 13)

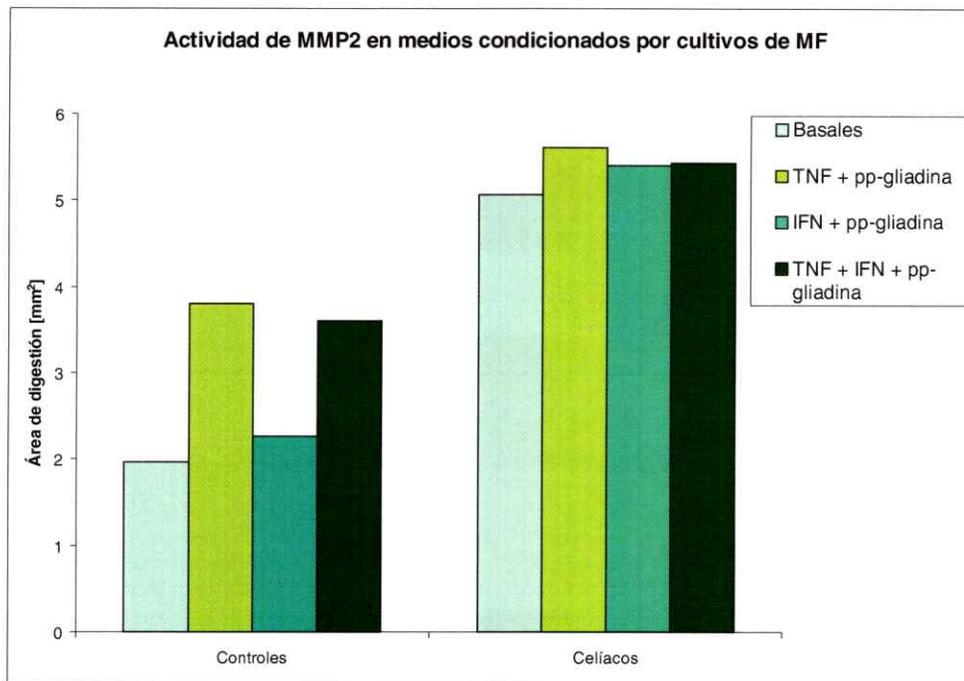


Figura 13. Actividad de MMP2 de pacientes celíacos y controles bajo distintos estímulos

3.4 Inmunohistoquímica para MMP1 y MMP3

Para observar la expresión de MMP1 y MMP3 en mucosa intestinal, se utilizaron cortes de tejido obtenido por biopsias perorales tanto de celíacos como de controles.

En las Figuras 14 y 15 se muestra la detección de MMP1 y MMP3 por inmunohistoquímica, observándose fluorescencia de mayor intensidad en los celíacos para ambas metaloproteinasas. Para la MMP1 esta mayor intensidad se observa por debajo de las células epiteliales intestinales tanto a nivel de las criptas como de la

superficie aplanada de los pacientes celíacos (Figura 14C). En los controles la tinción en las vellosidades es muy tenue y parece delimitar los MF subepiteliales (Fig 14A). La distribución y la intensidad de la fluorescencia en la tinción para MMP3, tanto en celíacos como controles, es similar a la observada para MMP1 (Fig 15). El control negativo muestra la especificidad de la detección en ambos casos, ya que las Figuras 14B y 15B muestran fluorescencia prácticamente indetectable cuando se incubó el corte de tejido directamente con el segundo anticuerpo. Esto no hace más que concordar con la idea de que en EC el desorden de la arquitectura de la mucosa intestinal, característica típica de la lesión de EC, se produce por una desregulación sobre la expresión de MMPs.

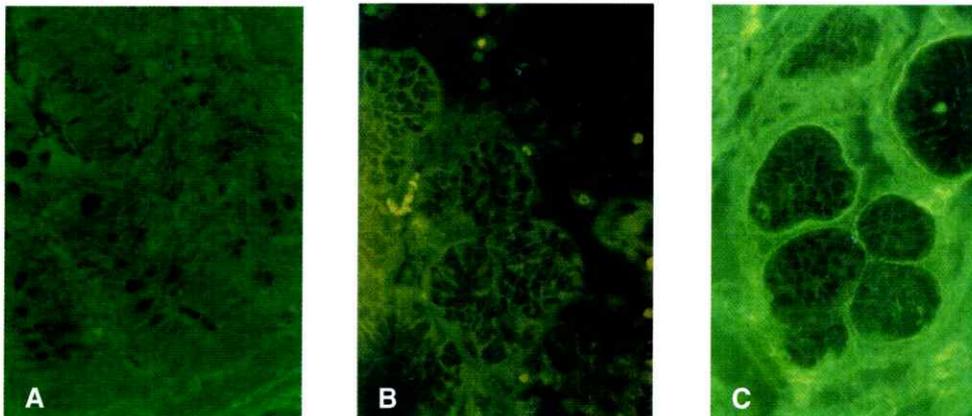


Figura 14. Inmunohistoquímica para MMP1. Normal (izquierda), Control negativo (centro) y celíaco (derecha)

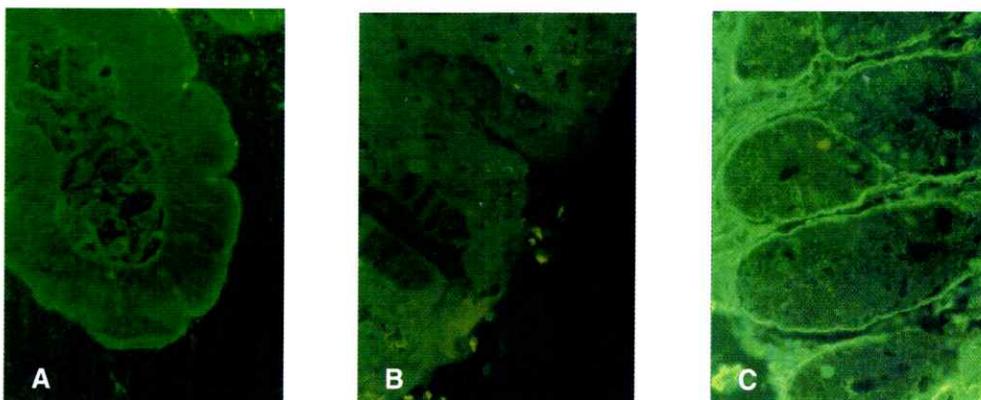


Figura 15. Inmunohistoquímica para MMP3. Normal (izquierda), Control negativo (centro) y celíaco (derecha)

3.5 Detección de MMP3

La expresión de MMP3 en poblaciones de MF provenientes tanto de pacientes controles sanos como de celíacos se midió a través de un kit comercial para la detección de dicha metaloproteinasa.

En la Figura 16 se observa que las poblaciones de MF de pacientes celíacos reaccionan más a los estímulos, y que presentan niveles de MMP3 significativamente superiores a los de pacientes celíacos en condiciones basales ($p < 0,14$). Del mismo modo, al estimular poblaciones de MF con dos citoquinas relacionadas con procesos inflamatorios, se observó una tendencia al aumento en la expresión de MMP3 tanto con TNF- α como con IFN- γ respecto a las condiciones basales.

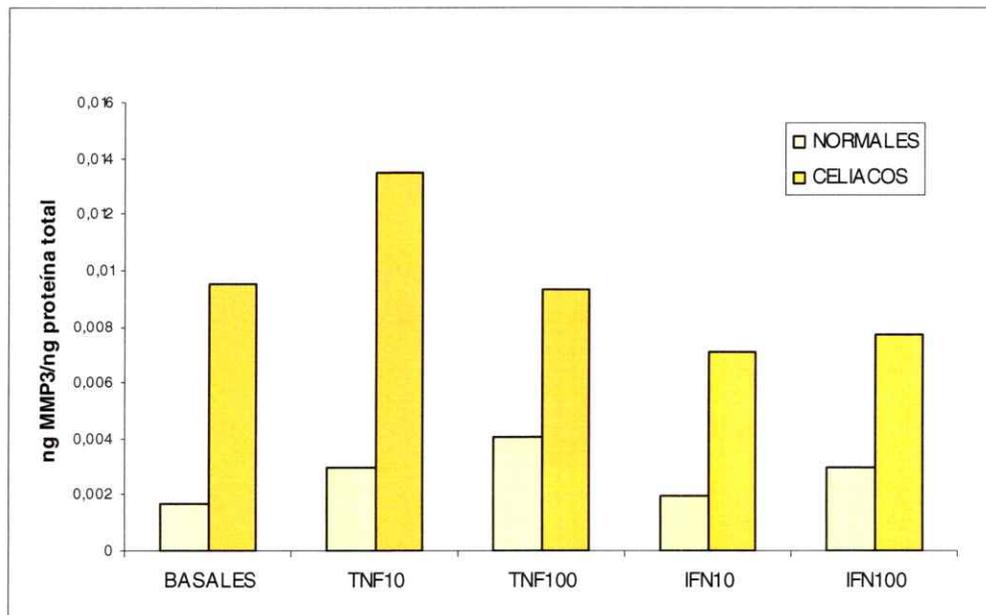


Figura 16. Concentración de MMP3 en medios condicionados por MF

DISCUSION

En condiciones fisiológicas normales, en los procesos de modelación y reestructuración de la arquitectura tisular, existe un equilibrio entre la apoptosis, proliferación y diferenciación celular que involucra a una serie de células y moléculas producidas por ellas mismas. En el caso del tracto gastrointestinal los tipos celulares participantes son principalmente células epiteliales (enterocitos), MF, células M y las mononucleares del corion entre otras; estas poblaciones celulares secretan en conjunto y coordinadamente factores específicos que guían la modelación del tejido a través de procesos como estimulación de la diferenciación celular e inducción de apoptosis (estos dos procesos como parte del desarrollo de la unidad cripta – vellosidad) y mantención de la matriz extracelular (MEC).

En la renovación constante de la MEC (*turn-over*) están involucrados las MMPs y sus respectivos inhibidores, los TIMPs. En condiciones normales, existe un equilibrio dinámico MMPs ↔ TIMPs, de manera que ante un determinado estímulo ambiental - generalmente asociado con daño mecánico- responderán dando lugar a la degradación de la matriz (papel de las MMPs) y la posterior síntesis de nuevos componentes dirigida sitio-específicamente por los tipos celulares ya mencionados; tal es el caso de la laminina, fibronectina y colágeno IV, productos de síntesis de los MF.

Diversos estudios en EC han identificado y descrito los perfiles de secreción de algunas de las moléculas involucradas en el mantenimiento de la arquitectura de la mucosa intestinal, y evidenciado un aumento en la expresión y actividad de MMPs (1, 2 y 3 principalmente) (Daum y col, 1999) y una disminución en la transcripción de sus respectivos TIMPs (Salmela y col, 2002). Mediante la hibridación in situ (FISH) estos

autores detectaron un aumento en la expresión de dichas moléculas en biopsias de pacientes con EC, que estaba localizada principalmente en los MF subepiteliales. Al detectar MMP1 y MMP3 por inmunohistoquímica, nuestros resultados mostraron fluorescencia de mayor intensidad en los celíacos que en los controles para ambas metaloproteinasas. Esto concuerda con las observaciones hechas por los autores mencionados anteriormente localizando esta sobre-expresión en la monocapa de MF subepiteliales (Figs 16 y 17). Otras investigaciones mencionan un significativo aumento en la transcripción de mRNA para MMP1, MMP3 y MMP12, que en su conjunto abarcan las modificaciones a la gran mayoría de los componentes de la MEC (Salmela y col, 2002)

Basándonos en que los MF subepiteliales están activamente involucrados en el proceso de modelamiento de la MEC y en la conformación de la estructura de la mucosa intestinal, decidimos dirigir el presente trabajo hacia el análisis de poblaciones de MF aisladas desde biopsias duodenoyeyunales y sus productos de síntesis. Creemos que esto representa un enfoque novedoso respecto de las investigaciones previas dado que en ellas se analizan cambios en los perfiles de secreción de variadas moléculas (MMPs, TIMPs, citoquinas y otros) a nivel tisular, sin identificar, sin embargo, el tipo celular involucrado.

La EC está caracterizada por una hiperreactividad inmune tipo Th1 que se desencadena en la mucosa intestinal de individuos genéticamente susceptibles mientras consumen gluten. Existe una correlación entre el nivel de respuesta Th1 y el grado de alteración histológica de la mucosa. (Chirido y col, 2005)

En la secuencia que lleva a la lesión histopatológica, el sistema MMPs-TIMPs podría ser uno de los principales efectores, dado que habría una importante disminución de

las proteínas sustrato de estos enzimas (Verbeke y col, 2002). Por este motivo es lógico pensar que los MF podrían ser los responsables del aumento de la síntesis, liberación y/o actividad de MMPs en pacientes celíacos ya que los MF del tracto gastrointestinal producen normalmente cantidades discretas de MMP que lentamente degradan la matriz proteica de la mucosa intestinal y existen evidencias de que algunas citoquinas proinflamatorias (respuesta Th1) como TNF- α e IL1- β inducen fuertemente la síntesis de MMP en este tipo celular. (Chirido y col, 2005).

Es importante destacar que el sistema de MMPs/TIMPs es regulado por complejos mecanismos que le permiten realizar el *turnover* de la MEC (diferenciación/proliferación/apoptosis). Una de las características de este sistema enzimático es que las MMPs son secretadas (todas, a excepción de MMP23) como zimógenos, es decir, requieren del clivaje de un péptido señal, muy conservado entre las MMPs que pertenecen a las distintas familias, para que puedan manifestar actividad catalítica. El mecanismo más probable de activación de las MMPs es a través de una cascada de clivajes, donde algunas MMPs activan a otras, tópico de importancia para nuestro estudio. Puntualmente, MMP3 activa a MMP1 y MMP9, que también es una colagenasa/gelatinasa cuya expresión y actividad ha sido detectada en tejidos que desarrollan procesos inflamatorios (Alexander, 2002). MMP9 a su vez, muestra un alto grado de similitud estructural con MMP2; basándonos en estos antecedentes y en el aumento de actividad de MMP2 mostrado por nosotros, podríamos pensar que MMP2 también podría ser activada por MMP3, apoyando nuestros resultados.

Nuestro modelo experimental consideró además la estimulación de los MF en cultivo por fracciones peptídicas de gliadina. Esta proteína presente en el trigo, y sus análogas de la cebada y el centeno, tienen epítopes altamente antigénicos los que, en individuos genéticamente predispuestos, desencadenarían la cascada patogénica de la EC. Esta capacidad inmunogénica fue descrita por De Ritis y col, quienes lograron desarrollar una lesión intestinal similar a la producida en EC al incubar péptidos de gliadina con muestras de tejido de biopsias intestinales de pacientes celíacos en remisión. Esto indicaba que algunas porciones de la gliadina (péptidos) -y no la molécula completa- eran las responsables de provocar dicha lesión. Lo anterior, asociado a una condición previa de hipersensibilidad existente en las poblaciones de linfocitos T de los pacientes celíacos que secretan niveles de $TNF\alpha$ e $IFN-\gamma$ significativamente superiores, desencadenaría el proceso inflamatorio (Monteleone y col, 2001).

La producción de $IFN-\gamma$ de $TNF-\alpha$ por macrófagos y células T influye directamente sobre las células epiteliales. Estas citoquinas ejercen efectos citostáticos *in vitro* e inducen la muerte epitelial *in vivo*. $TNF-\alpha$ induce la expresión de KGF en MF, e indirectamente promueve el aumento en el número de células epiteliales, proceso que involucra otras citoquinas, como $TGF-\beta$. (Chirido y col, 2005)

Nuestro modelo consideró la exposición de los MF en cultivo a concentraciones significativas de las fracciones inmunogénicas de gliadina (>20 ppm) y la estimulación con dos de las principales citoquinas proinflamatorias: $TNF-\alpha$ e $IFN-\gamma$ (que *in vivo* provienen de los linfocitos T CD4+).

Al estimular tanto con $\text{INF-}\gamma$ como con $\text{TNF-}\alpha$ se detectó un aumento de la actividad enzimática que resultó dosis-dependiente para las concentraciones de 10 y 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (Fig. 11); no se observó diferencia en la actividad de MMP2 con las concentraciones menores. Finalmente, se decidió utilizar la concentración de 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$ para las experiencias posteriores debido a que esta se acercaba a la dosis de máxima respuesta de MMP2 respecto a la condición basal. Los controles presentaron una actividad menor que los pacientes celíacos aunque también fue dosis-dependiente. Los canales sembrados con medio de cultivo puro (control negativo) no mostraron áreas de actividad, lo que corrobora que el medio no aportó actividad enzimática por composición intrínseca.

En las figuras 12 y 13 se analizan los datos obtenidos de la evaluación de la actividad de MMP2, donde se observa una tendencia al aumento entre pacientes celíacos versus los controles (Fig. 12); esto podría indicar una mayor activación de las moléculas ya existentes o bien una mayor expresión basal de MMP2 en los MF de celíacos que en la de los MF provenientes de controles. En la figura 13, al reordenar los datos, observamos que los pacientes con EC ya parten con niveles más altos para la actividad de este enzima en comparación con los controles. Esta diferencia en condiciones basales ya es significativa, sin embargo, y a pesar de que esta tendencia se mantiene al estimular con ambas citoquinas, las diferencias entre los pacientes con EC en comparación con el grupo control disminuyen. Una explicación probable es que dado el alto nivel basal de actividad de MMP2 en pacientes con EC, el estímulo con citoquinas (tanto $\text{TNF-}\alpha$ como $\text{INF-}\gamma$) no provoca un aumento proporcional, ya que la actividad de MMP2 podría estar cercana a su nivel máximo (*plateau*). En estas figuras queda demostrado también que, las citoquinas estudiadas, cuya función *in vivo* es

amplificar las respuestas proinflamatorias, para el caso de la EC lo hacen, aumentando los niveles de actividad de MMP2.

Si bien se agregó pp-gliadina al medio de cultivo de los MF en algunos experimentos, creemos poco probable que esta fracción peptídica haya ejercido algún efecto directo sobre los MF y su producción de MMPs. Esto es respaldado por los resultados de las zimografías en gelatina en las cuales no se utilizó pp-gliadina, las cuales muestran áreas de digestión similares a los casos en que esta fue agregada. Esto resulta lógico ya que para que la pp-gliadina ejerza su efecto inmunogénico debe ser presentada por APCs que inducirán en linfocitos y células plasmáticas la producción de factores que desencadenan la respuesta característica de EC.

Estos resultados son diferentes de los de otros autores, quienes muestran que ante la exposición de biopsias de pacientes controles a linfocitos T activados, la expresión de MMP2 se mantiene inalterada (Salmela y col, 2002). Aunque estos autores demostraban la presencia de marcadores en estos linfocitos T que daban cuenta de su hiperreactividad frente a pp-gliadina, cuando eran extraídos de su medio natural (tejido de paciente celíaco) e incubados con tejido de pacientes controles, perdían la capacidad de generar la respuesta esperada, probablemente debido a la ausencia de moléculas coestimuladoras que permitan una respuesta de intensidad fuerte y sostenida.

Teniendo en cuenta nuestros resultados, y de acuerdo con todo lo comentado, el sistema de metaloproteinasas de la mucosa intestinal en la EC estaría alterado, permitiendo una mayor degradación de la matriz y colaborando en la desorganización de la arquitectura normal de la mucosa intestinal.

Un punto interesante de destacar es que los resultados obtenidos, además de mostrar un aumento generalizado de MMPs al comparar celíacos y controles, ponen en evidencia diferencias entre las distintas MMPs en los pacientes celíacos. Así, MMP1 y MMP3 presentan un aumento mucho mayor que el de MMP2 tal como lo evidencian las técnicas de ELISA e inmunohistoquímica (Figs. 12, 14, 15). Estos resultados nos permiten inferir que el remodelamiento de la membrana basal y matriz extracelular del epitelio intestinal depende de la degradación de las moléculas que la componen (colágenos tipo I, II, III y IV, agreganos, proteoglicanos, laminina y fibronectina principalmente) que a su vez se relaciona con el patrón de secreción de MMPs y TIMPs, que apunta directamente tanto a los MF como a sus productos.

En los individuos cuya composición genética los predispone a desarrollar EC, el gluten de la dieta altera a los MF subepiteliales y al patrón de síntesis y secreción de sus productos, los que en conjunto con la reacción inmune dirigida contra los componentes del epitelio intestinal, apoyaría que los MF tendrían un lugar preponderante en el desarrollo de la lesión que altera gravemente la arquitectura normal de la mucosa intestinal y que caracteriza a esta patología.

CONCLUSIONES

El estudio de la actividad de MMPs en cultivos de MF subepiteliales de pacientes con EC y controles realizado en esta tesis nos permite concluir los siguientes conceptos:

- Los MF de individuos con EC que no están en dieta libre de gluten presentan niveles de MMPs significativamente superiores a los encontrados en pacientes controles. Esto indica que habría un desequilibrio en el proceso de remodelación de la MEC del epitelio intestinal en estos pacientes, y que podría estar generado por los MF.
- Los MF subepiteliales de pacientes celíacos responden a la presencia de gluten en la dieta con un aumento significativo en la actividad de MMPs. Así mismo, estos niveles descienden al entrar la enfermedad en remisión (Dieta libre de gluten).
- La estimulación de cultivos de MF de pacientes normales con citoquinas proinflamatorias (TNF- α y IFN- γ) hace que su actividad de MMPs aumente a niveles similares a los presentados por MF de pacientes con EC. Esto muestra que los MF subepiteliales son células que responden a citoquinas proinflamatorias, lo que respaldaría la idea de que la patogenia de la EC está favorecida por la acción de citoquinas que son características de la vía Th1 de la respuesta inmune adaptativa.
- Con toda probabilidad, los MF subepiteliales no tienen por sí mismos la capacidad de responder a la exposición directa a pp-gliadina. Esto indicaría que dentro de la secuencia de fenómenos inmunológicos involucrados en la

patogenia de la lesión, los MF subepiteliales son uno de los blancos del proceso que lleva a la desregulación de todo el aparato inmunitario de la mucosa intestinal en la EC.

- Teniendo en cuenta todos los antecedentes antes planteados, la lesión intestinal característica de la EC sería provocada principalmente por la desregulación en la secreción de MMPs por parte de los MF subepiteliales.

BIBLIOGRAFÍA

- Alexander P. 2002. Matrix Metalloproteinases (MMPs). *En Oncogen Catalog and Technical Guide 2002/2003*. pp 488 – 489. CN Biosciences. California, USA
- Alpers DH. Digestion and absorption of carbohydrates and proteins. *En Johnson L.(ed) Physiology of the gastrointestinal tract*. pp 1723 - 1749. Raven Press, New York
- Badman MK, Flier JS. 2005. The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars. *Science* **307**: 1909 - 1914
- Brandtzaeg P. 1995. Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system. *APMIS* **103**; 1 – 19
- Brandtzaeg P. 1998. Development and basic mechanisms of human gut immunity. *Nutr Rev.* **56**; S5 - S18
- Bronstein H D, Haeffner L J, Kowlessar O D. 1967. Enzymatic digestion of gliadin: the effect of the resultant peptides in adult celiac disease. *Clin Chim Acta* **14**: 141
- Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos C, Madara J, Hopkins A y col. 2003. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J. Immunol* **171**: 6164 – 6172
- Brunser O, Luft JH. 1970. Fine structure of the apex of absorptive cells from rat small intestine. *J Ultrastruct Res* **31**: 291 - 311
- Catassi C, Fornaroli F, Fasano A. 2002. Celiac disease: From basic immunology to bedside practice. *Clin Appl Immunol Rev* **3**: 61 - 67
- Chirido F, Cherñavsky A. 2005. Autoinmunidad órganoespecífica: Una visión global sobre la Enfermedad Celíaca. *En Rabinovich G (ed), Inmunopatología moecular: nuevas fronteras de la medicina*. pp 485 - 492. Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina
- Clemente MG, Musu MP, Frau F, Brusco G, Sole G, Corazza GR y col. 2000. Immune reaction against the cytoskeleton in coeliac disease. *Gut* **47**: 520 - 526.
- Clemente MG, De Virgiliis S, Kang JS, Macatagney R, Musu MP, Di Pierro y col. 2003. Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut* **52**: 218-223
- Cornell H.J; Townley R.R.W. 1973. Investigation of possible intestinal peptidase deficiency in coeliac disease. *Clin Chem Acta.* **43**: 113 - 125
- Daum S, Bauer U, Foss HD, Schuppan D, Stein H, Riecken EO y cols. 1999. Increased expression of mRNA for matrix metalloproteinases-1 and -3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in intestinal biopsy specimens from patients with celiac disease. *Gut*, **44**: 17 - 25

De Ritis, G; Occorsio, P y cols. 1979. Toxicity of wheat flour proteins and protein-derived peptides for *in vitro* developing intestine from rat fetus. *Pediat. Res.* **13**: 1255 - 1261

Dewar D, Pereira S, Ciclitira P. 2003 The pathogenesis of coeliac disease. *Int J Biochem Cell Biol* **36**: 17 - 24

Di Sabatino A, Ciccocioppo R, D'Aló S, Parroni R, Millimaggi D, Cifone MG y col. 2001. Intraepithelial and lamina propria lymphocytes show distinct patterns of apoptosis whereas both populations are active in Fas based cytotoxicity in coeliac disease. *Gut* **49**: 380 - 386.

Esposito C, Paparo F, Caputo I, Porta R, Salvati V, Mazzarella G y col. 2003. Expression and enzymatic activity of small intestinal tissue transglutaminase in celiac disease. *Am J Gastroenterol* **98**, 8: 1813 - 1820.

Farrel RJ, Kelly CP. 2002. Current Concepts: Celiac Sprue. *N Engl J Med* **346**; N° 3:180 - 188

Frazer AC, Fletcher RF, Ross CAC, Shaw B, Sammons HG, Schneider R. 1959. Gluten-induced enteropathy: The effect of partially digested gluten. *Lancet* ii, 252-255

Freeman HJ. 2004. Adult celiac disease and the severe "flat" small bowel biopsy lesion. *Digest Dis Sci* **49**,4: 535 - 545.

Green, Peter H.R., Jabri, B. 2003. Coeliac Disease. *Lancet* **362**: 383 - 391

Gauthier GF. Muscular tissue. 1973. *En: Histology*. Greep RO y Weiss L, (eds). Tercera edición. New York: Mc Graw Hill Book Company. Pp 217 - 247

Giovannini C, Matarrese P, Scazzocchio B, Vari R, D'archivio M, Straface E y col. 2003. Wheat gliadin induces apoptosis of intestinal cells via an autocrine mechanism involving Fas-Fas ligand pathway. *FEBS Letters* **540**: 117 - 124.

Halttunen T, Mäki M. 1999. Serum immunoglobulin A from patients with celiac disease inhibits human T84 intestinal crypt epithelial cell differentiation. *Gastroenterology* **116**: 566 - 572.

Hankey GL, Holmes GK. 1994. Coeliac disease in the elderly. *Gut* **35**: 65 - 67

Heuschkel RB, MacDonald TT, Monteleone G, Bajaj-Elliott M, Walker Smith JA, Pender SLF. 2000. Imbalance of stromelysin-1 and TIMP-1 in the mucosal lesions of children with inflammatory bowel disease. *Gut* **47**: 57 - 62

Hill ID, Dirks MH, Liptak GS, Colletti RB, Fasano A, Guandalini S y cols. 2005. Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the Northamerican Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *JPGN* **40**: 1-19

- Isolauri E y Salminen S. 2005. Probiotics, gut inflammation and barrier function. *Gastroenterol Clin North Am.* **34**:437-50
- James SP. 2003. Immunologic, gastroenterologic, and hepatobiliary disorders. *J Allergy Clin Immunol* **111**: S645 – S658
- Jennings J, Howdle P. 2003. New developments in celiac disease. *Curr Op Gastroenterol.* **19**: 118 - 129
- Kraus, T A; Toy, L; Chan, L; Childs, J; Mayer, LI. 2004. Failure to induce oral tolerance to a soluble protein in patients with Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* **126**: 1771 - 1778
- Ludvigsson JF, Montgomery SM, Ekbom A. 2005. Celiac disease and risk of adverse fetal outcome: a population-based cohort study **129**: 454 - 483
- Madara JL, Trier JS. 1994. The functional morphology of the mucosa of the small intestine. *En Johnson L.(ed) Physiology of the gastrointestinal tract.* 1577 - 1622. Raven Press, New York
- Mahida YR, Beltinger J, Marsh S, Goke M, Gray T, Podolsky DK. 1997. Adult human colonic subepithelial myofibroblasts express extracellular matrix proteins and cyclooxygenase -1 y -2. *Am J Physiol* **273**: G1341 - 1348
- Maiuri L, Ciacci C, Auricchio S, Brown V, Quarantino S, Londei M. 2000. Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology* **119**: 996 – 1006
- Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S y col. 2003. Association between innate response to gliadina and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet* **362**: 30 - 37
- MacDonald TT, Monteleone G. 2005. Immunity, Inflammation and allergy in the gut. *Science* **307**: 1920 – 1925
- Matysiak-Budnik T, Candalh C, Dugave C, Abdelkader N, Cellier C, Cerf-Bensussan N y cols. 2003. Alterations of the intestinal transport and processing of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology* **126**: 698 - 707
- Mc Mowat A. 2003. Coeliac disease. A meeting point for genetics, immunology, and protein chemistry. *Lancet* **361**: 1290 - 1292
- Mearin ML y Mulder CJJ. 1991. Coeliac disease. 40 years gluten-free. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers
- Monteleone G, Pender SLF, Alstead E, Hauer AC, Lionetti P, MacDonald TT. 2001. Role of Interferon- α in promoting T helper cell type 1 responses in the small intestine in coeliac disease. *Gut.* **48**: 425 - 429

- Murch S. 2004. Oral tolerance and gut maturation. *En Allergic diseases and the environment*. Isolauri E, Walker WA (editors). Basilea: S Karger AG. Vevey: Nestec. 133 - 151
- Nilsen EM, Lundin KE, Krajci P, Scott H, Sollid LM, Brandtzaeg P. 1995. Gluten specific, HLA-DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon γ . *Gut* **37**: 766 - 776.
- Polanco I, Esteban MM. 2003. Diagnóstico de la Enfermedad Celíaca. *Pediátrika* **23**: 154 - 157
- Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. 1999a. Myofibroblasts I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* **277**: C1 - C19
- Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. 1999b. Myofibroblasts II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol* **277**: C183 - C201
- Salmela MT, MacDonald TT, Black D, Irvine B, Zhuma T, Saarialho - Kere U y col. 2002. Upregulation of matrix metalloproteinases in a model of T cell mediated tissue injury in the gut: analysis by gene array and in situ hibridisation. *Gut*, **51**: 540 - 547
- Sanders MA, Basson M. 2003. Collagen IV regulates CaCo-2 migration and ERK activation via $\alpha_1\beta_1$ - and $\alpha_2\beta_1$ - integrin dependent Src kinase activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. **286**: G547 - G557
- Schuppan D. 2000. Current Concepts of Celiac Disease Pathogenesis. *Gastroenterology*. **119**: 234 - 242
- Shanahan F. 1994. The intestinal immune system. *En Johnson L.(ed) Physiology of the gastrointestinal tract*. 643 - 684 Raven Press, New York
- Sollid, LM. 2000. Molecular basis of Celiac Disease. *Ann Rev Immunol* **18**: 53 - 81
- Sollid LM. 2002. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nature Immunology* **2**: 647 - 655.
- Stephen P. James, MD. 2003 Immunologic, gastroenterologic, and hepatobiliary disorders. *J Allergy Clin Immunol*; **111**: S645 - S658
- Sumiyoshi H, Mor N, Lee S, Doty S, Henderson S, Tanaka S y col. 2004. Esophageal muscle physiology and morphogenesis require assembly of a collagen XIX-rich basement membrane zone. *J Cell Biol* **166**: 591 - 600
- Tatham A, Gilbert S, Fido R, Shewry P. 2000. Extraction, Separation, and purification of wheat gluten proteins and related proteins of barley, rye, and oats. *En Marsh M (ed). Celiac Disease: Methods and Protocols*. pp 55 74. Humana Press. Totowa, New Jersey

- Toner PG, Carr KE, Wyburn GM. The digestive system – an ultrastructural atlas and review. 1971. Londres Ed. Butterworths.
- Toscano V, Conti FG, Anastasi E, Mariani P, Tiberti C, Poggi M y col. 2000 Importance of gluten in the induction of endocrine autoantibodies and organ dysfunction in adolescent celiac patients. *Am J Gastroenterol* **95**: 1742 - 1748
- Trier JS. 1998. Diagnosis of celiac sprue. *Gastroenterology*. **115**:211-6
- Vader LW, de Ru A, van de Wal Y. 2002. Specificity of tissue transglutaminase explains cereal toxicity in celiac disease. *J Exp Med* **195**: 643 – 649.
- Ventura A, Magazzu G, Greco L. 1999. Duration of exposure to gluten a risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. *Gastroenterology* **117**: 297 - 303
- Verbeke S. 2000. Estudio de enfermedad celíaca en San Luis y su asociación con otros trastornos con base inmunológica. Tesis. Argentina: Universidad Nacional de San Luis.
- Verbeke S, Gotteland M, Fernandez M, Bremer J, Ríos G, Brunser O. 2002. Basement membrane and connective tissue proteins in intestinal mucosa of patients with coeliac disease. *J Clin Patol* **55**: 440 - 446
- von Lampe B, Barthel B, Coupland SE, Riecken EO, Rosewicz S. 2000. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **47**: 63 - 73
- Walker W. A. 2002. Development of the intestinal mucosal barrier. *JPGN*. **34**: S33 - S39
- Walsh J. 1994. Gastrointestinal hormones. *En* Johnson L.(ed) *Physiology of the gastrointestinal tract*. 1 - 128 Raven Press, New York