



Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado
Biología Gradua / Grado en Biología

Gen *LPP* : Avances en el conocimiento de uno de los genes candidato de la enfermedad celíaca

Egilea/Autora:
Beatriz Peñalver González
Zuzendaria/Director/a:
Jose Ramón Bilbao Catalá

© 2015, Beatriz Peñalver González

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
• Epidemiología	6
• Patogénesis	6
• Genética	9
MATERIALES Y MÉTODOS	13
• Cultivo celular	13
• Extracción de ARN y análisis de expresión mediante RT-qPCR	15
• Silenciamiento del gen <i>LPP</i>	16
• Análisis de datos	17
RESULTADOS	17
• Expresión del gen <i>LPP</i>	17
• Expresión del gen <i>LPP</i> en presencia de gliadina	18
• Silenciamiento del gen <i>LPP</i>	19
DISCUSIÓN	20
AGRADECIMIENTOS	21
BIBLIOGRAFÍA	21
MATERIAL SUPLEMENTARIO	24

RESUMEN

La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía autoinmune de predisposición genética, producida por la ingestión en la dieta de péptidos derivados de cereales como el trigo o la cebada. Aunque se creía que afectaba casi de forma exclusiva a los individuos europeos (1%), actualmente se conocen casos en todo el mundo. El modelo patogénico se centra en los mecanismos de la inmunidad adaptativa dependientes de la estimulación de linfocitos T CD4+ reactivos, pero existe además un efecto tóxico directo del gluten sobre el epitelio intestinal, dependiente de la inmunidad innata. La participación de la Genética en la susceptibilidad a la enfermedad es conocida desde hace tiempo, siendo el locus HLA el que explica aproximadamente el 40% del componente genético de la enfermedad. Para tratar de identificar otros genes con susceptibilidad, se han venido realizando múltiples esfuerzos durante los últimos años. Uno de los últimos, llevado a cabo en 2011, fue el Proyecto ImmunoChip. En él, se analizaron más de 200.000 variantes y se descubrieron 13 nuevos *loci* de riesgo para la EC, que junto con los descubiertos en anteriores trabajos y el locus HLA, daban un total de 40 *loci* de riesgo. Entre ellos, se encontraba la región que ocupa el gen *LPP*. Localizado en el cromosoma 3, un estudio reciente lo vincula con los procesos de adhesión celular en el intestino. En el presente trabajo, se ha estudiado el efecto de la gliadina sobre la expresión del gen de interés (*LPP*) y el posible efecto de un silenciamiento del mismo sobre dos genes relacionados con las uniones celulares (*ACTB* y *TJP1*). En el caso de la gliadina, no se halló un cambio significativo en la expresión del gen. Mientras, los resultados del efecto del silenciamiento fueron dispares, no siendo concluyentes para el gen *ACTB*, pero encontrando una posible asociación entre los genes *LPP* y *TJP1*.

ABSTRACT

The celiac disease (CD) is an autoimmune enteropathy of genetic predisposition, produced by the dietary intake of peptides derived from grains like wheat or barley. Although it was believed that it affected almost exclusively to European individuals (1%), is currently known cases worldwide. The pathogenic model focuses on the mechanisms of adaptive immunity dependent of the stimulation of reactive CD4+ T lymphocytes, but there is also a direct toxic effect of gluten on the epithelium dependent of innate immunity. The participation of Genetic susceptibility to the disease is long known, with the HLA locus which accounts for about 40% of the genetic component of the disease. To try to identify other susceptibility genes, numerous efforts have been made in recent years. One of the latest, held in 2011, was the ImmunoChip Project. In it, more than 200,000 variants were analyzed and 13 new risk *loci* for the CD were discovered, together with those found in previous work and the HLA locus, gave a total of 40 risk *loci* were discovered. One of these, was the region with the *LPP* gene. Located on chromosome 3, a new study links it to the processes of cell adhesion in the intestine. In this paper, it has been studied the effect of gliadin on the expression of the gene of interest (*LPP*) and the possible effect thereof on silencing two genes related to cell junctions (*ACTB* and *TJP1*). For the gliadin, a significant change was not found in gene expression. Meanwhile, the effect of silencing results were mixed and not being conclusive for the *ACTB* gene, but finding a possible association between *LPP* and *TJP1* genes.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad celíaca (EC) puede definirse como una enteropatía autoinmune de predisposición genética, cuya característica más notable es el aplanamiento de la mucosa del intestino delgado. Crónica e inflamatoria, está producida por la ingestión en la dieta de péptidos derivados del trigo (gliadinas y gluteninas), cebada (hordeínas), centeno (secalinas), avena (aveninas) e híbridos de estos cereales (García, 2013; Fernández-Jiménez, 2014). En la actualidad, el único tratamiento eficaz para tratar esta afección es la dieta sin gluten (DSG) de por vida, eliminando la presencia de éstos productos de la alimentación (Feighery, 1999; Di Sabatino et al. 2009).

La EC es conocida desde hace unos 2.000 años, pero no fue hasta el año 1950 cuando fue descubierta la causa de la afección, de manos del holandés Willem Karel Dicke. Pocos años después, Marcelo Royer (1955) y Margot Shiner (1956) describían el procedimiento para la realización de biopsias intestinales, que fue fundamental para poder confirmar el diagnóstico de esta enfermedad, dado que reveló el aplanamiento característico de la mucosa al exponerla al gluten y la respuesta de la misma en una DSG.

En el caso de no existir tratamiento, los síntomas que suelen presentarse son aquellos relacionados bien con el intestino delgado (diarrea, distensión abdominal o náuseas), o con una mala absorción (bajo peso, falta de grasa, debilitamiento muscular) entre otros (Feighery, 1999). A nivel histológico, se produce una degeneración progresiva del intestino delgado. La lesión característica puede reconocerse en varias fases interrelacionadas, descritas por Marsh en 1992 y cuyo resultado final, es una atrofia de las vellosidades intestinales y una hiperplasia de las criptas (Figura 1). Además de los síntomas asociados al intestino, aparecen una serie de autoanticuerpos dependientes del gluten, como son los anticuerpos antiendomisio (EMA) o antitransglutaminasa (TGA) (Stenman et al., 2008).

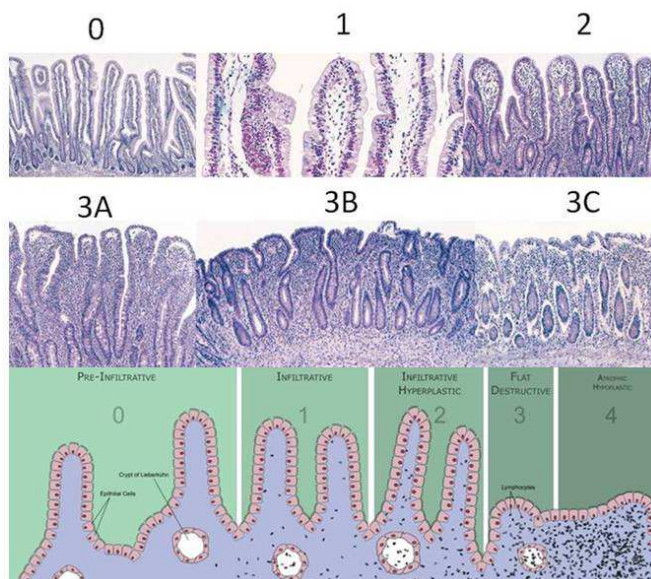


Figura 1. Distintas fases de la CD en el intestino delgado, según la clasificación de Marsh. La lesión Tipo 0, preinfiltrativa, se caracteriza por una mucosa de morfología normal, aunque con la inmunidad humoral local alterada; Tipo 1, o lesión infiltrativa, se mantiene la arquitectura normal de la mucosa, pero comienza la infiltración de los linfocitos intraepiteliales (LIE), que aumentan en número (>25/100 enterocitos); Tipo II, lesión hiperplásica, se caracteriza por criptas alargadas o hiperplásicas y se mantiene la altura de las vellosidades y la infiltración de LIE; Tipo III, lesión destructiva, es la lesión típica diagnóstica, con pérdida de vellosidades y reorganización tisular; Tipo IV, lesión hipoplásica, es una verdadera lesión atrófica, con formación de depósitos de colágeno, observada en un pequeño grupo de pacientes que no responden a la dieta sin gluten (EC refractaria). Imagen tomada de la página web <http://virchowseye.blogspot.com.es/2010/04/marsh-classification-celiac-disease.html>.

En base a las características patológicas que presenta la enfermedad, la Asociación Europea de Gastroenterología, Hepatología y Alimentación Pediátrica, ha establecido una serie de criterios diagnósticos. Estos criterios, incluían una biopsia del intestino delgado y una prueba serológica hasta hace un par de años (Mäki et al., 1995), momento en el que se adoptaron criterios nuevos. Estos últimos, establecen que se puede prescindir de la biopsia duodenal siempre que el niño/a sea sintomático y presente unos anticuerpos TGA en niveles 10 veces superiores a la normalidad. Se puede realizar también, un genotipado de los antígenos leucocitarios humanos (HLA), ya que no es común presentar la enfermedad sin presentar alguno de los alelos de riesgo (Husby et al., 2012).

Epidemiología

La frecuencia de la EC en el oeste de Europa es de aproximadamente un 1% (Dubé et al., 2005). Aunque se creía que se trataba de una enfermedad que afectaba casi de forma exclusiva a los individuos europeos, gracias a los nuevos test serológicos y a su difusión, se han encontrado casos en poblaciones escogidas al azar de Norte América y Australia con una frecuencia de 1:100 y de 1:200 respectivamente (Cataldo et al., 2007; de Kauwe et al., 2009). Lo mismo ha ocurrido en China y Centroamérica, donde se han descrito casos esporádicos y se han publicado pequeñas series de estudios en el caso de China y Panamá. A pesar de la falta de datos, es posible que la prevalencia de la EC en China y Japón sea baja debido a que ambas naciones tienen, mayoritariamente, una dieta basada en el consumo de arroz. Sin embargo, esta dieta está siendo paulatinamente reemplazada por la de tipo occidental, que se caracteriza por incluir alimentos con alto contenido en trigo (Cummins et al., 2009). La EC podría llegar a convertirse en un problema de salud en China, previéndose también una situación similar en Centroamérica, aunque en los pueblos alejados de las capitales el consumo del gluten podría ser menor. Los cambios ambientales, sociales y culturales en estas regiones tan diferentes entre sí, permiten prever un aumento de casos de la EC (Pérez et al., 2013).

Patogénesis

La interacción de factores genéticos y ambientales (contacto con las proteínas del gluten) en los individuos susceptibles genéticamente, lleva a la pérdida de tolerancia al gluten y al desarrollo de una lesión intestinal, caracterizada por un aumento de linfocitos en el epitelio y lámina propia, pérdida de vellosidades, apoptosis de enterocitos y remodelación de la mucosa, aumento de la permeabilidad y la presencia de anticuerpos anti-transglutaminasa. El modelo patogénico se centra en los mecanismos de la inmunidad adaptativa dependientes de la estimulación de linfocitos T CD4+ reactivos, que reconocen péptidos de gluten deamidados por el enzima transglutaminasa tisular (TG2) junto a moléculas HLA-DQ2/DQ8, y la producción de citocinas pro-inflamatorias, en especial IFN- γ . El gluten tiene además un efecto tóxico directo sobre el epitelio, dependiente de la inmunidad innata y cuyo principal mediador es la interleucina 15 (IL-15), que se manifiesta por la expresión de moléculas de estrés en los enterocitos y la activación de la función citotóxica de los linfocitos intraepiteliales (LIE) (Arranz et al., 2007).

El gluten es una mezcla de gluteninas monoméricas y gliadinas poliméricas ricas en prolamina, péptidos inmunogénicos, frente a los que los pacientes con EC muestran distinta sensibilidad e incluso, un mismo paciente, podría responder a más de uno. En condiciones normales, los péptidos proteicos son hidrolizados en la luz del intestino, dando lugar a otros más pequeños o a aminoácidos aislados mediante peptidasas gástricas, pancreáticas y del borde en cepillo intestinal, antes del transporte transepitelial a la lámina propia mucosa (Arranz et al., 2007). En el caso del gluten, las proteasas intestinales no pueden hidrolizar completamente estas proteínas, generando fragmentos de entre 10-15 aminoácidos (Fernández-Jiménez, 2014). Esta digestión intraluminal incompleta, origina fragmentos residuales de gran tamaño, que no se absorben fácilmente a través de los mecanismos normales que siguen las proteínas de la dieta y se convierten en sustratos perfectos para la transglutaminasa (TG2) (Arranz et al., 2007).

La TG2 es una enzima ampliamente distribuida en el organismo, cuya principal función es catalizar la modificación de proteínas mediante transamidación o deamidación (Arranz et al., 2007). En los pacientes con EC, la TG2 se expresa en el borde en cepillo epitelial y en la zona subepitelial de la lámina propia mucosa (Molberg et al., 1998) y tiene un papel fundamental en el mecanismo patogénico. Mediante la modificación enzimática de los péptidos de gliadina, aumenta su afinidad por la molécula HLA-DQ (Arentz-Hansen et al., 2000), pero además, es el principal autoantígeno de los anticuerpos séricos específicos que tienen gran valor en el diagnóstico de la enfermedad (Dieterich et al., 1997). El principal sustrato exógeno de la TG2 es la gliadina, que contiene aminoácidos de carga positiva. La transglutaminasa induce la sustitución ordenada y específica de residuos de glutamina por otros de ácido glutámico con carga negativa (Arentz-Hansen et al., 2000), lo que favorece la interacción con otros aminoácidos básicos localizados en posiciones de anclaje de las moléculas HLA-DQ2 y DQ8, y aumenta su capacidad de estimular a los linfocitos T CD4+ (Molberg et al., 1998; van de Wal et al., 1998). La digestión intraluminal incompleta del gluten, como el péptido de 33 aminoácidos de la alfa-gliadina (De Stefano et al., 2006; Piper et al., 2007), cuyo contenido en glutamina y prolina confiere resistencia a la proteólisis por los enzimas digestivos, favorece la formación de grandes fragmentos, que son los sustratos preferidos de la TG2.

En la EC activa, se ha observado un aumento del transporte a través del epitelio tanto de fragmentos tóxicos como inmunogénicos (Matysiak-Budnik et al., 2003). Los péptidos tóxicos, no reconocidos por las células T, tienen un efecto rápido e inespecífico sobre el epitelio, mientras que la respuesta a los péptidos inmunogénicos es más tardía. Tras atravesar el epitelio para llegar a la lámina propia de la mucosa, sufren deamidación por la TG2 para unirse con alta afinidad a las moléculas HLA-DQ2 o DQ8, presentes en las membranas de células presentadoras de antígenos (CPA) locales, tales como las células dendríticas (CDs). Las CPA son las encargadas de presentarlos a los linfocitos T específicos de gluten, que los reconoce. Estas respuestas inmunológicas (innata y adaptativa) desencadenan distintos mecanismos de lesión, con citotoxicidad epitelial y reestructuración de la matriz extracelular (la denominada transformación mucosa) (Arranz et al., 2007).

1. Respuesta innata:

La respuesta innata es la primera barrera defensiva frente a los patógenos y se activa tras el contacto con estos agentes infecciosos (Fernández-Jiménez, 2014). Algunos fragmentos del gluten, como p31-39 o 31-43 de la alfa-gliadina, inducen una respuesta inmunológica inmediata de tipo innato, aunque los mecanismos no están completamente dilucidados (Ellis et al., 2001). La gliadina es capaz también de debilitar las uniones de tipo tight-junctions localizadas entre las células del epitelio intestinal (Clemente et al., 2003).

El principal mecanismo que desencadena la respuesta innata depende de la liberación de IL-15 por los enterocitos (Di Sabatino et al., 2006). De hecho, en la EC se observa expresión de IL-15, tanto en los enterocitos del epitelio superficial como en las células mononucleares de la lámina propia de la mucosa (Maiuri et al., 2000; Mention et al., 2003). La IL-15 favorece la supervivencia, activación y proliferación de los LIEs, que se localizan en la zona basolateral de las células epiteliales y desempeñan un papel importante en la vigilancia inmunológica del epitelio intestinal. La IL-15 favorece la retroalimentación de la respuesta inmunológica al inducir la secreción de mediadores de inflamación no específicos por los LIE. Además de los efectos innatos como la reprogramación de los LIE (Meresse et al., 2004; Hue et al., 2004; Ebert, 2005) o la inducción de moléculas de estrés/MICA en los enterocitos (Martin-Pagola et al., 2004), la IL-15 puede actuar también como un claro nexo de unión entre ambos tipos de respuestas inmunológicas, al ser un potente activador de las CD4⁺ (Ohteki et al., 2001; Mattei et al., 2001) y, con ello, de los linfocitos T CD4⁺ específicos.

2. Respuesta adaptativa:

El sistema inmune adaptativo induce la inmunidad mediante células T y el sistema inmune humoral, estando ambos activos en la mucosa del intestino delgado de los pacientes con EC (Fernández-Jiménez, 2014). La inmunidad adaptativa mediada por linfocitos T específicos requiere que CPAs que presentan las moléculas HLA-DQ2/DQ8 en sus membranas, presenten los antígenos (pequeños péptidos de gluten) a los linfocitos T de la lámina propia. Las principales CPAs de la lámina propia mucosa son los macrófagos (20%) y, sobre todo, las CD4⁺ (80%). Las CPAs pueden ser activadas también como consecuencia de la IL-15 liberada durante la respuesta innata inducida por el gluten (Ouaaz et al., 2002, Monteleone et al., 2001).

Los linfocitos T CD4⁺ de la lámina propia mucosa, al reconocer los péptidos de gliadina modificados por la TG2 y presentados junto a moléculas HLA-DQ2 o DQ8 por las CD4⁺ (Anderson et al., 2000; Monteleone et al., 2001; Arentz-Hansen et al., 2002; Mowat et al., 2003; Raki et al., 2006), dan lugar a una respuesta dominada por citocinas de perfil Th1, con predominio de IFN- γ y otras citosinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-18, entre otras) y a un descenso proporcional de citocinas reguladoras o de función anti-inflamatoria (IL-10 y TGF- β) (Nilsen et al., 1998; Leon et al., 2005). Este conjunto de respuestas estarán implicadas, en última instancia, en los mecanismos de remodelación tisular.

Genética

A pesar del desconocimiento que existe respecto al patrón de heredabilidad de la EC, no ocurre lo mismo con la genética, de la que desde hace tiempo se sabe de su participación activa en la susceptibilidad frente a la enfermedad. Los estudios de prevalencia de la EC en familias afectadas y en especial aquellos que comparan gemelos, han resultado de mucha utilidad para estimar la proporción en la que factores ambientales por un lado y factores genéticos por otro, contribuyen al desarrollo de esta compleja afección. De acuerdo con estos estudios, la genética es fundamental, no sólo en el desencadenamiento de la enfermedad, sino también en el desarrollo posterior de la misma (Fernández-Jiménez, 2014).

Está ampliamente aceptado que la proporción de gemelos monocigóticos en la que ambos desarrollan la EC, está entre el 75-86%, mientras que en los gemelos dicigóticos esta proporción se reduce a un 16-20%. Estas diferencias, han permitido estimar el componente genético de la EC, mucho mayor que en otras enfermedades inmunológicas complejas como la diabetes de tipo 1 (Sollid et al., 1993). Además, las proporciones concordantes encontradas entre hermanos y gemelos dizigóticos son prácticamente las mismas, lo que estaría indicando una mínima contribución del factor ambiental, frente al genético, respecto al desarrollo de la enfermedad. Esta acumulación de evidencias ha permitido calcular que la heredabilidad de la enfermedad, la proporción atribuible a los factores genéticos, comparados con los ambientales, está entorno al 87% (Greco et al., 2002).

1. Región HLA

HLA es el nombre que recibe el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) en humanos. Se trata de un superlocus localizado en el cromosoma 6p21 y que contiene una gran cantidad de genes relacionados con la respuesta inmune. Los genes HLA codifican proteínas presentadoras de antígenos que se expresan en la gran mayoría de las células humanas, siendo esenciales para la distinción entre moléculas propias (endógenas) y extrañas (exógenas) por parte del organismo. Son, por tanto, genes que están involucrados en muchas afecciones inflamatorias y autoinmunes (Fernández-Jiménez, 2014).

En el caso de la EC, la región HLA es el locus de mayor susceptibilidad, explicando aproximadamente el 40% del componente genético de la enfermedad. La primera evidencia confirmando la asociación entre la región HLA y la EC fue publicada en 1973 (Ludwig et al., 1973). Estudios moleculares posteriores han identificado los genes HLA de clase II que codifican para las moléculas HLA-DQ2 y HLA-DQ8 (Figura 2) , como los factores directamente implicados, siendo el HLA-DQ2 el que mayor asociación presenta. El 90% de los pacientes con EC presentan al menos, una copia del heterodímero HLA-DQ2.5, formado por la combinación de los productos (DQA1*05 y DQB1*02). Sin embargo, aunque se trate de la variante en la que más asociación se observa, entre un 20 y un 30% de la población no celíaca también lo presenta, lo cual indica que aunque importante, no es suficiente para desarrollar la enfermedad. El resto de pacientes que no presentan este genotipo, son portadores

de la variante HLA-DQ8 y por tanto tienen, al menos, una copia del haplotipo que contiene los alelos DQA1*03:01 y DQB1*03:02 (Mäki et al., 1997).

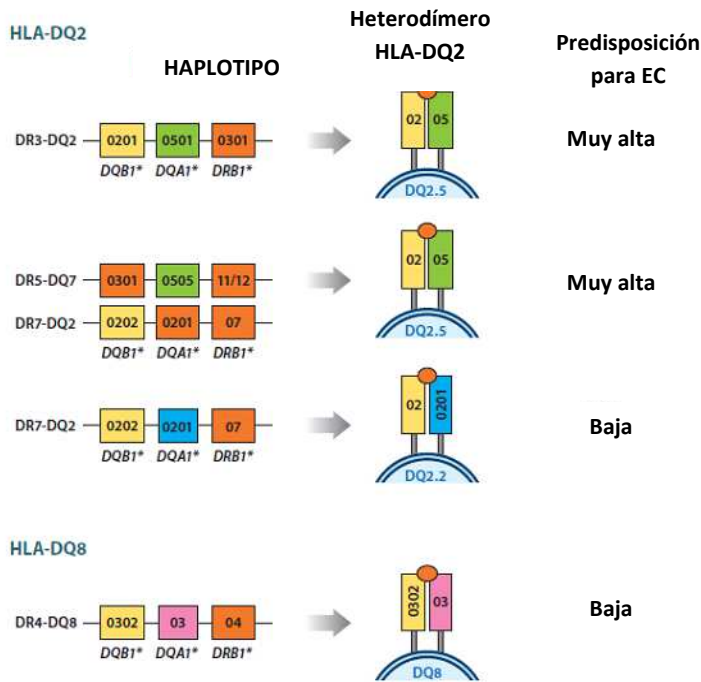


Figura 2. Antígenos leucocitarios humanos (HLA) asociados a la enfermedad celíaca (EC). Imagen adaptada de Abadie et al. 2011.

Las variantes HLA-DQ2 y DQ8 presentan desequilibrio de ligamiento con DR3 y DR4 respectivamente, es por ello que en muchas ocasiones se les denomina DR3-DQ2 y DR4-DQ8 a estos haplotipos (Sollid et al., 1989). En algunos de estos haplotipos, como en el caso de DR3-DQ2, los dos alelos del heterodímero HLA-DQ2.5 se localizan en el mismo cromosoma, codificándolo en *cis*. Mientras que los individuos heterocigotos portadores de los haplotipos DR5-DQ7 y DR7-DQ2, los alelos se localizan en distinto cromosoma, codificando el dímero en *trans*.

Por otro lado, se ha observado que existe relación entre el número de heterodímeros DQ2.5 y la susceptibilidad a padecer EC, siendo aquellos individuos homocigotos para el haplotipo DR3-DQ2 o heterocigotos para el haplotipo DR3-DQ2/ DR7-DQ2 los que más predisposición tienen a desarrollar la enfermedad (van Belzen et al., 2004; Ploski et al., 1993; Lundin et al., 1993). De hecho, son los pacientes homocigotos para DR3-DQ2, los que presentan mayor cantidad de casos de EC refractaria, que no responden frente a una DSG.

La asociación entre la EC y los genes HLA de clase II se encuentra en el papel que desempeñan los linfocitos T CD4+ en el desarrollo de la enfermedad. Estas células, en el caso de los pacientes con EC, son capaces de reconocer los péptidos derivados del gluten que aparecen en el intestino. Esto es debido a que las células presentadoras de antígenos (CPA) que portan las moléculas HLA-DQ2 o DQ8 en sus membranas, presentan estos epitopos a los linfocitos T CD4+, estimulando su proliferación (Schuppan et al., 2009). Las moléculas HLA-DQ2 y DQ8 tienen una alta afinidad por este tipo de péptidos derivados de la gliadina, aumentada si cabe, tras su modificación por la enzima

transglutaminasa tipo 2(TG2), que cataliza una reacción que aumenta la carga negativa de estos péptidos, favoreciendo la unión y por tanto la presentación de estas moléculas a las células T CD4+.

2. Búsqueda de genes relacionados con la susceptibilidad a EC

El locus HLA únicamente puede explicar el 40% de la susceptibilidad genética a padecer EC, es por ello, que se han venido realizando múltiples esfuerzos durante los últimos años, para tratar de identificar genes con susceptibilidad, distintos de los HLA. Recientemente, se han realizado estudios de asociación de genoma completo (GWAS) donde se han genotipado y analizado miles de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). Estos últimos estudios, han posibilitado la identificación de gran cantidad de *loci* asociados, aunque se deberán realizar estudios funcionales para confirmar la implicación de los genes candidatos (Fernández-Jiménez, 2014).

Los dos GWAS llevados a cabo para el estudio de la EC, junto con subsiguientes estudios de confirmación, han revelado la existencia de 26 regiones asociadas, distintas de la HLA (van Heel et al., 2007; Hunt et al., 2008; Dubois et al., 2010). El último y más reciente estudio a gran escala llevado a cabo para identificar variantes asociadas, tanto para la EC como para otras enfermedades autoinmunes, ha sido el Proyecto ImmunoChip, en el que se han identificado 13 regiones adicionales más asociadas con la EC (Trynka et al., 2011). Como resultado, se ha elevado el número de regiones asociadas a 40, contando la región HLA.

2.1. Proyecto ImmunoChip

El Proyecto ImmunoChip se desarrolló con el objetivo de resolver cuestiones aún pendientes, relacionadas con la predisposición genética a la enfermedad, como tratar de conocer la mayor parte de la heredabilidad genética de la enfermedad aún sin descubrir y la identificación tanto de variantes como de genes causales. Para ello, se llevó a cabo un genotipado denso de 183 *loci*, distintos de los de la región HLA, previamente asociados con enfermedades inmunes en un total de 12.041 individuos con EC y 12.228 individuos control. Más de 200.000 variantes fueron analizadas y se descubrieron 13 nuevos *loci* de riesgo para la EC, que junto con los anteriormente descubiertos y el locus HLA, daban un total de 40 *loci* de riesgo (Trynka et al., 2011), uno de los cuales aparecía asociado a la región que ocupa el gen *LPP* (Figura 3).

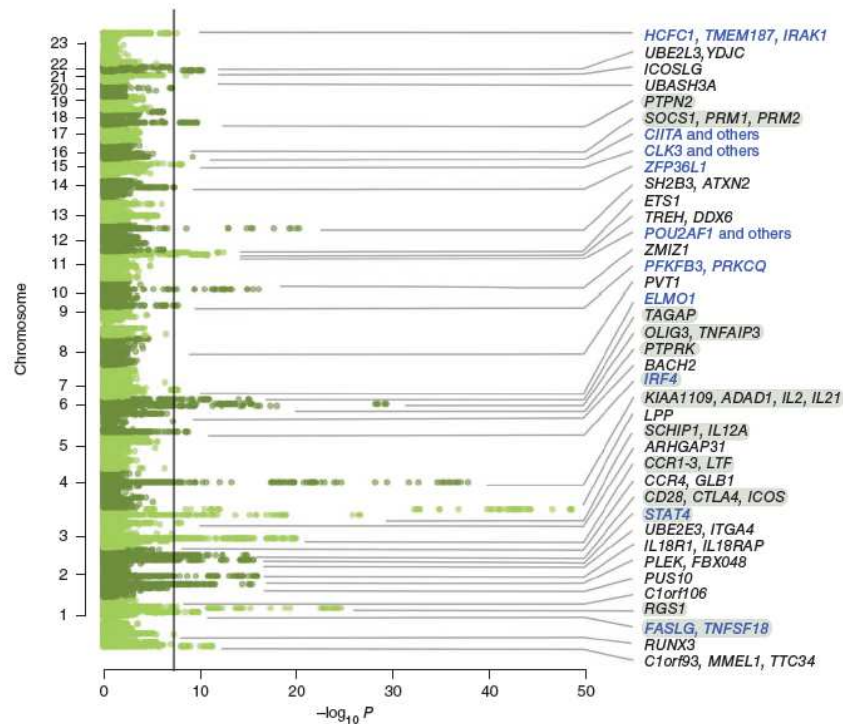


Figura 3. Gráfico Manhattan de asociación estadística para los loci de riesgo de la EC. Los nuevos loci identificados aparecen en azul; los loci con varias señales aparecen subrayados en gris. El umbral de significación utilizado ha sido $P=5 \times 10^{-8}$. Imagen adaptada de Trynka et al. 2011.

Muchos de los *loci* contienen genes candidato con función inmunológica, aunque sólo un puñado de marcadores se encuentra en regiones exónicas, de los cuales sólo tres generan cambios en las proteínas. Gran parte de las señales se localizan en las cercanías de las regiones de inicio de transcripción y región 3'UTR de genes específicos. Estos resultados sugieren que estas variantes podrían tener efecto influyendo regiones reguladoras.

2.2. Gen *LPP*

Uno de los genes candidatos causales propuestos para la EC es el gen *LPP*. Localizado en el cromosoma 3 (3q28), un estudio reciente lo vincula con los procesos de adhesión celular en el intestino (Kumar et al., 2014). Este resultado concuerda con los de otros estudios, que relacionan el gen con funciones en la reordenación del citoesqueleto de actina y en las rutas de adhesión celulares, que son cruciales para el mantenimiento de la función de barrera del epitelio intestinal (Clemente et al., 2003; Monsuur et al., 2005). Además de esta función estructural, podría estar implicado en rutas de señalización y activación de la transcripción de genes, transduciendo las señales desde las zonas de adhesión al núcleo. Parece también servir como proteína de anclaje para distintos complejos proteicos tanto en el citoplasma como en el núcleo (Ebert et al., 2004; Petit et al., 2000).

La elección de este gen como candidato, se debe a que la señal más significativa encontrada durante el Proyecto ImmunoChip, corresponde a la región intrónica 2, de unos 70 kb, de este gen, concretamente al SNP rs2030519. Tras estudiar dicha región, se ha conseguido definir un haplotipo de 2,8 kb en el que se ha encontrado el que se cree el SNP funcional de este locus, rs4686484 y que

está en alto desequilibrio de ligamiento (LD) con el top SNP rs2030519. Este SNP se encuentra en una región reguladora y también aparece asociado al sitio de unión de un factor de transcripción, pero no se ha encontrado ninguna unión causal entre él y el gen *LPP*. Además de ello, a pesar de haberse observado menores niveles de expresión del gen en pacientes con EC, al analizar biopsias de individuos con este SNP no se encontraron diferencias de expresión significativas con los que no lo presentaban. Por lo tanto, la función reguladora del SNP rs4686484 podría afectar a genes localizados fuera del bloque haplotípico, manteniéndose desconocidos los mecanismos que subyacen en la desregulación del gen *LPP* (Almeida et al., 2013).

El presente estudio tiene por objeto silenciar el gen de interés (*LPP*) en células intestinales sin EC y observar el efecto que tiene este silenciamiento sobre la expresión de otros genes relacionados con las uniones celulares (*ACTB* y *TJP1*) (GeneCards®, Weizmann Institute of Science), que aparecen alteradas en los pacientes con EC. Además, se estudiará la expresión del gen *LPP* en presencia de gliadina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio del gen *LPP*, el primer paso fue comprobar su expresión en las células que iban a ser utilizadas. Una vez confirmada su expresión, se procedió a realizar las pruebas de expresión con gliadina y de silenciamiento. La primera de ellas, para analizar el posible efecto de la presencia de esta proteína sobre los niveles de expresión del gen y la segunda para estudiar posibles relaciones con otros genes involucrados en la adhesión celular.

1. Cultivo celular

El estudio se llevó a cabo con la utilización de dos líneas celulares: T84 (ATCC® CCL248™) y C2BBE1 [clon de Caco2] (ATCC® CRL2102™), ambas formadoras de cultivos adherentes. Las células T84 provienen de tejido epitelial del colón, de un hombre de 72 años, derivadas de una metástasis del pulmón. No hay presencia del cromosoma X ni del cromosoma número 13; los cromosomas 2, 4 y 22 aparecen una sola vez y del cromosoma 12 aparecen 4 copias. Las células C2BBE1, son enterocitos de la región del colón, de un hombre de 72 años con adenocarcinoma colorectal. No presentan anomalías cromosómicas.

Las células se recibieron congeladas. El proceso de descongelación se llevó a cabo introduciendo el tubo con las células en un baño a 37°C con agitación durante 2 minutos. Transcurrido ese tiempo, se sacó el recipiente del baño, se desinfectó con etanol al 70% y se transfirió el contenido del mismo a un tubo de centrifuga que contenía 9 ml de medio de crecimiento (previamente calentado a 37°C durante 15 minutos y con un pH 7-7,6). El medio de crecimiento suministrado, consistía en una mezcla de DMEM 4,5 g/L de Glucosa y con L-Glutamina (Lonza, cat. N° BE12-604F) para las células C8BBE1 y DMEM-F12 (Lonza, cat. N° DE14-801F) para las células T84, con FBS previamente inactivado por calor a 56°C (Lonza, cat. N° DE14-801F) y Pen-Strep 10.000 Upenicilina/ml y

10.000 Uestreptomicina/ml (Lonza, cat. N° DE17-602E) . Se centrifugó la mezcla durante unos 5-7 minutos a 125g y se resuspendió el pellet, añadiendo 8-10 ml de medio de crecimiento para cultivarlas en flask de 25 ml. Todas las manipulaciones de los cultivos celulares se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar, para evitar contaminaciones.

Los cultivos de ambos tipos celulares se mantuvieron en incubación a 37°C y 5% de CO₂, en flask con una superficie de cultivo de 75 cm², durante el tiempo que duró el experimento. Aproximadamente cada 2-3 días se realizó un cambio de medio y se comprobó el estado de las células (adhesión, viabilidad, contaminación) con la ayuda de un microscopio invertido. El cambio de medio consistió en retirar el medio anterior, lavar el cultivo con HBSS (BioWhittaker®, LONZA) (5-10 ml) y añadir medio nuevo (8-10 ml).

Para mantener los cultivos en fase de crecimiento exponencial, se realizaron varios pases o cambios de flask, durante las distintas pruebas que se realizaron. Para ello, se procedió a limpiar el cultivo con HBSS (5-10 ml). Posteriormente, se añadieron 500 µl de tripsina (Trypsin-EDTA 0,25% solution, SIGMA-ALDRICH®) para acabar de limpiar y 1,5 ml más después, que se dejaron durante 15 minutos para acabar de despegar las células de flask. Transcurrido ese tiempo, se vertió el contenido en un tubo de centrifuga al que se le añadieron 8,5 ml de medio de crecimiento. Se centrifugó la mezcla a 300g durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml de medio. Seguidamente, se procedió al recuento de células viables. Para ello, se tomaron 10 µl de la suspensión celular y se mezclaron con 10 µl de Trypan Blue Stain (Gibco®, Invitrogen™) (1/10 diluido en PBS (Life-science, SIGMA-ALDRICH®)), que tiñe las células muertas, de forma que pudieran diferenciarse las células viables durante el conteo. De la mezcla de células y TrypanBlue, se tomaron 10 µl y se cargaron en un hemocitómetro. Tras el conteo, conocido ya el número de células por mililitro, se tomó la cantidad necesaria para el pase (aproximadamente 200.000 células) a un nuevo flask.

Los distintos componentes del medio de crecimiento a excepción del FBS, así como el propio medio, el HBSS y la tripsina (1X) se almacenaron a 4°C; el FBS y la tripsina (10x) a -20°C y el TripanBlue a temperatura ambiente.

Cultivo celular con gliadina

Se cultivaron por triplicado células del tipo C2BBe1, mediante el procedimiento descrito, en medios de crecimiento con distinta composición durante 13 días: medio normal, medio con gliadina digerida (500 µg/ml) y medio con BSA digerido (500 µg/ml). El cultivo con BSA se llevó a cabo para descartar una posible interferencia por parte de las enzimas pepsina y tripsina, utilizadas en la digestión, en los niveles de expresión del gen *LPP* .

Tanto la gliadina (G-3375, SIGMA-ALDRICH®), como el BSA (HyClone™ SH30574.03, GE Healthcare Life-Science) fueron previamente digeridos con pepsina (P6887, SIGMA-ALDRICH®) y tripsina (T9201, SIGMA-ALDRICH®). Se tomaron en cada caso, 2,5 g de gliadina o de BSA y se mezclaron

con 25 ml de ácido clorhídrico 0,2N en un tubo Falcon de 50 ml. Tras añadir 25 mg de pepsina a la mezcla se incubó a 37°C en agitación durante toda la noche.

Al día siguiente y tras ajustar el pH de la mezcla a 7.4 con hidróxido sódico 1N, se añadieron 25 mg de tripsina y se dejó incubando 5h a 37°C en agitación. Transcurrido ese tiempo, se hirvió a 100°C durante una hora para inactivar las enzimas, en una cubeta de cristal y manteniendo la agitación. Finalmente, se centrifugó 10 minutos a 2000g y tomando el sobrenadante, se hizo pasar la mezcla por unos filtros de 0,20 µm para su esterilización. Las muestras se guardaron en alícuotas de 500 µl a -80°C.

Por último, para descartar una posible contaminación de las muestras se llevó a cabo el test PYROGENT® Plus Single Test Vials (endotoxin detection) y para comprobar que la digestión se había llevado a cabo correctamente, se realizó una electroforesis. Esta última prueba, se realizó en gel de acrilamida con SDS al 12% y mediante un equipo BIO-RAD PROTEAN® Tetra Cell. En el gel se cargaron 100 µl de las mezclas antes de la digestión, tras el ajuste de pH y tras la adición de la tripsina.

Para conocer la concentración de proteínas se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop 1000 y se realizaron las mediciones a 280nm.

2. Extracción de ARN-total y análisis de expresión mediante RT-qPCR

La extracción de ARN de los distintos cultivos celulares se llevó a cabo utilizando el kit NucleoSpin® miRNA (Macherey-Nagel). En total, se llevaron a cabo tres extracciones: para analizar la expresión del gen *LPP* en las células T84 y C2BBE1, para comprobar la expresión del gen *LPP* al adicionar gliadina al medio de cultivo y por último, para la prueba de silenciamiento. Las concentraciones de la cantidad de ARN extraído, se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 1000, a 260 nm.

Las mediciones de expresión del gen *LPP* se realizaron mediante RT-qPCR. Para ello, se utilizó un termociclador (Illumina) y las lecturas de los resultados se obtuvieron a través del programa Eco-illumina (Illumina). Para la cuantificación de la expresión, se aplicó el método de cuantificación relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), utilizando para la normalización de la misma el gen endógeno de control *RPLPO*. En el caso de la prueba de silenciamiento, se analizaron también los niveles de expresión de los genes *ACTB* y *TJP1* para comprobar un posible efecto sobre los mismos al silenciarse el gen de estudio. Para la realización de las pruebas se utilizó el kit QuantiTect Probe RT-PCR (Qiagen), sondas Taqman® Gene Expression Assays 20X (*RPLPO*: cat. Nº 4326314E; *LPP*: Hs00944352_m1; *ACTB*: Hs99999903_m1; *TJP1*: Hs01551861_m1; Applied Biosystems) y RNase out (20 U/µl) (Applied Biosystems). La placa de amplificación dispone de 48 pocillos. El volumen final utilizado en las amplificaciones fue de 10 µl en todos los casos. Las muestras se sometieron a las siguientes condiciones de amplificación establecidas en el kit utilizado: 30 minutos a 50°C (transcripción

reversa), 15 minutos a 95°C (activación de la polimerasa, inicio de la PCR), 15 segundos a 94°C (desnaturalización) y finalmente 1 minuto a 60°C (anillamiento y extensión), con un total de 40 ciclos.

Expresión del gen LPP

Para la comprobación de expresión del gen *LPP* se utilizó además del gen *RPLPO* como control endógeno, el gen *CLK3* como control positivo, ya que en estudios previos se ha confirmado su expresión en estos tipos celulares. Las pruebas de expresión se realizaron tanto en células T84 como en C2BBE1 y por triplicado, además de incluir un blanco, también por triplicado. La cantidad de ARN por muestra fue de 15 nanogramos para ambos tipos celulares. A los blancos se les añadió agua hasta completar el volumen total.

Expresión del gen LPP en presencia de gliadina

Una vez realizada la extracción de RNA de los cultivos celulares crecidos en las tres condiciones (medio de crecimiento, medio de crecimiento con gliadina digerida y medio de crecimiento con BSA digerido), se prepararon las muestras para la amplificación. En este caso la cantidad de RNA añadido por muestra fue de 8 nanogramos. Cada una de las muestras extraídas se preparó por duplicado, incluido el blanco.

Silenciamiento del gen LPP

En esta prueba, además del gen *LPP* y el gen *RPLPO* como control endógeno, se comprobaron los niveles de expresión de los genes *ACTB* y *TJP1*. Para ello, se utilizaron dos cultivos con condiciones distintas, el primero con células con niveles de expresión del gen de estudio sin modificar y el segundo con células con dicho gen silenciado. Las muestras se prepararon por triplicado, añadiendo 15 nanogramos de RNA a cada una y los blancos se hicieron por duplicado.

3. Silenciamiento del gen LPP

La prueba de silenciamiento se llevó a cabo en las células tipo T84, utilizando siRNA duplexo y mediante la técnica de transfección mediada por lípidos. La transfección se hizo estando estas en suspensión (reverse transfection), antes de que se quedaran adheridas a la base del pocillo.

El siRNA fue suministrado por IDT, se recibió liofilizado (2 nmol) y se resuspendió en 100 µl de agua libre de nucleasas, para obtener la concentración deseada para el silenciamiento. Seguidamente, se procedió a eliminar la adherencia de las células del cultivo mediante la adición de tripsina y al recuento de las mismas (del mismo modo que se hizo para los pases de flask). Al mismo tiempo, se prepararon los pocillos donde se iba a llevar a cabo el proceso, que se hizo por duplicado (en uno se añadió el siRNA y en otro un siRNA control (AllStars Negative Control siRNA, Qiagen), según el procedimiento Lipofectamine™ RNAiMAX reverse transfection (Invitrogen™). En cada uno de ellos se añadieron 100 µl de Opti-MEM® I Reduced Serum Medium 1X (GIBCO) (medio de crecimiento), 15pmol de siRNA (prueba o control) y 1 µl de Lipofectamina™ RNAiMAX(Invitrogen™) (formación micelios para la introducción del siRNA en las células).

Durante el proceso, tanto el OptiMem como los medios de crecimiento con y sin antibiótico, el HBSS y la tripsina se mantuvieron a 37°C; el siRNA, siRNA control y la lipofectamina en hielo; y el ML Lysis Buffer a temperatura ambiente.

Una vez realizado el recuento de células, se inocularon las necesarias en medio sin antibiótico para reducir la toxicidad respecto a la lipofectamina, de forma que al añadir 400 µl de esta mezcla en cada uno de los pocillos, se obtuviera una cantidad aproximada de 50.000 células en cada uno. Finalizada la adición, se dejaron los cultivos durante toda la noche incubando a 37°C y 5% CO₂. A la mañana siguiente, una vez producido el proceso de transfección, se retiró el medio sin antibiótico, se limpió el cultivo con HBSS, se añadió medio con antibiótico (500 µl) y se dejó incubando 48 horas para que se produjera el silenciamiento.

Transcurrido este tiempo, se procedió a romper las células con ML Lysis buffer (300 µl), después de retirar el medio de crecimiento y de limpiar los cultivos con PBS (500 µl). Tras la adición del Lysis buffer se dejaron incubando los cultivos 5 minutos a temperatura ambiente. Después de lo cual, se tomó el contenido completo de cada pocillo y se guardó en eppendorfs a -80°C, para la posterior extracción de RNA.

4. Análisis de datos

Los resultados obtenidos en la prueba de expresión del gen *LPP* con células creciendo en presencia de gliadina, se comprobaron estadísticamente con la prueba no paramétrica de U Mann-Whitney, utilizando el programa SPSS Statistics de IBM®.

RESULTADOS

1. Expresión del gen *LPP*

El análisis de expresión del gen *LPP* confirmó su presencia en ambos tipos celulares. El ciclo umbral medio (Ct) obtenido para el gen *RPLPO* fue 19,75±0,39 en las células T84 y 19,95±0,30 en las células C2BBE1, mientras que los Ct para el gen *LPP* fueron 24,30±0,10 y 22,43±0,19 en las células T84 y C2BBE1 respectivamente (Figuras 4 y 5).

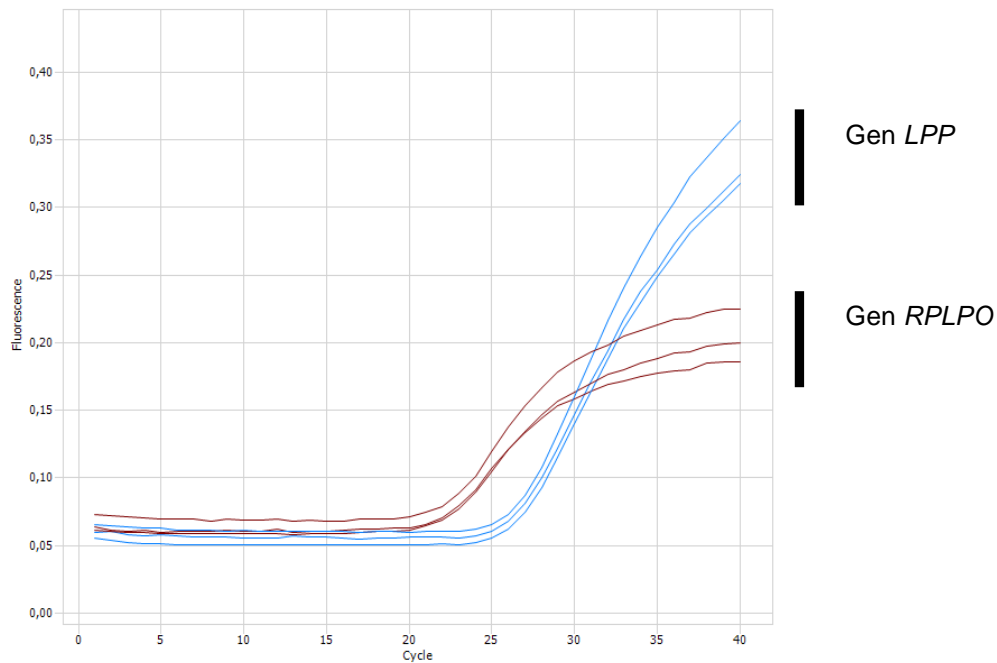


Figura 4. RT-qPCR para la comprobación de la expresión del gen LPP en células T84. Los trazos azules corresponden a las tres réplicas del gen de estudio. Los trazos marrones a las tres réplicas del gen endógeno de control, RPLPO .

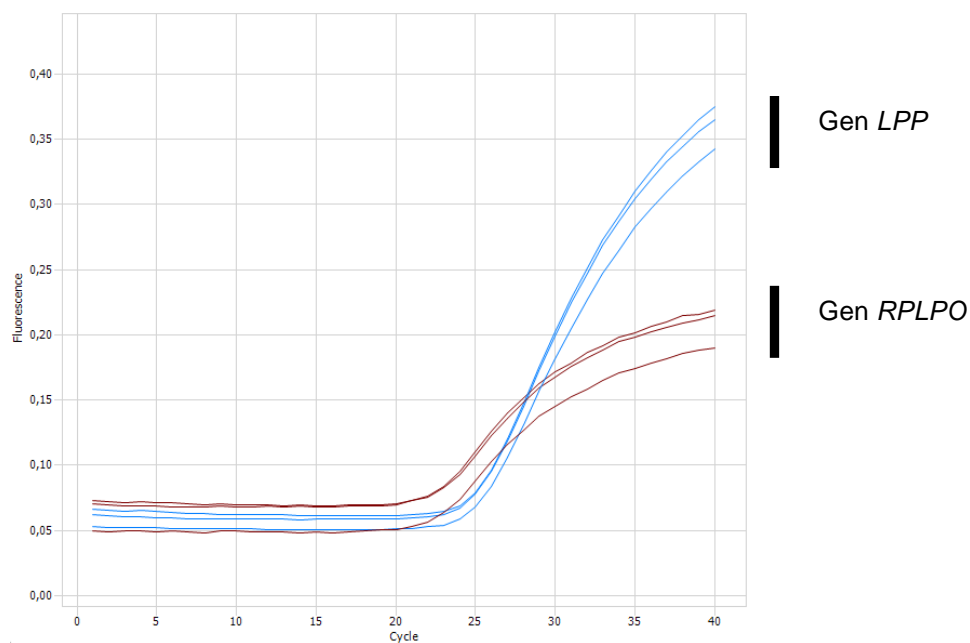


Figura 5. RT-qPCR para la comprobación de la expresión del gen LPP en células C2BBE1. Los trazos azules corresponden a las tres réplicas del gen de estudio. Los trazos marrones a las tres réplicas del gen endógeno de control, RPLPO .

2. Expresión del gen LPP en presencia de gliadina

Los datos obtenidos fueron muy similares entre los niveles de expresión del gen en las células de la muestra control y las cultivadas adicionando BSA o gliadina. Todas las amplificaciones tuvieron un valor de Ct alrededor de 23 (Tabla suplementaria 1). Se sometieron los resultados de las RT-qPCR (control, BSA y gliadina) al método $2^{(-\Delta Ct)}$ de expresión relativa (Figura 6) y se realizó la prueba no paramétrica de U Mann-Whitney. Los p-valores obtenidos para cada par de grupos de datos fue de

0,7 para el par control-gliadina; 0,4 para el par control-BSA y 0,7 para el par gliadina-BSA (valor umbral de significación 0,05).

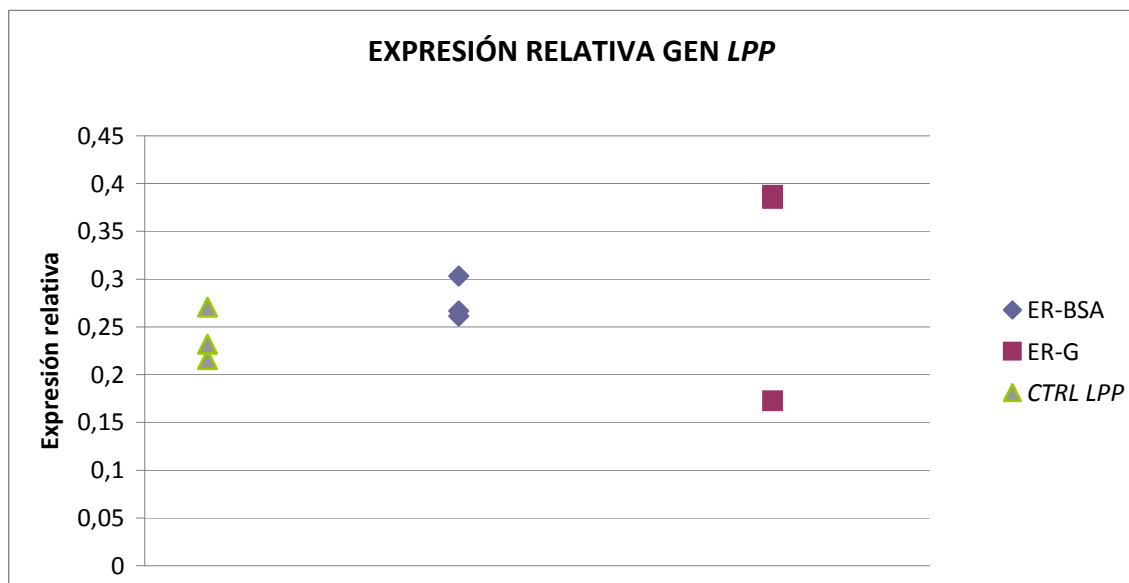


Figura 6. Gráfico con la distribución de los valores de expresión relativa obtenidos en cada una de las réplicas y cultivos celulares. CTRL-LPP (células crecidas en medio de crecimiento control); ER-BSA (células crecidas en medio con BSA); ER-G (células crecidas en medio con gliadina). Fórmula de expresión relativa: $2^{-(Dct)}$.

3. Silenciamiento del gen LPP

Los resultados obtenidos tras la prueba de silenciamiento, mostraron un aumento del valor Ct medio del gen LPP en los cultivos de células con silenciamiento, $27,29 \pm 0,16$ ciclos frente a los $26,46 \pm 0,39$ del cultivo sin tratamiento (Tabla suplementaria 2). En lo que respecta al gen ACTB, se desecharon los resultados relativos a la tercera réplica del gen RPLPO, muestra control-ACTB y los resultados de la 2ª y 3ª réplicas del gen RPLPO muestra silenciamiento-ACTB, ya que sus Ct se desviaban considerablemente de los demás obtenidos para el gen RPLPO (Tabla suplementaria 2). Por último, los valores de expresión obtenidos para el gen TJP1 aumentan al silenciar el gen LPP. El valor Ct medio en el cultivo control es de $28,14 \pm 0,43$ ciclos, frente a los $27,70 \pm 0,45$ ciclos en el cultivo con silenciamiento (Tabla suplementaria 2).

Al aplicar el método de cuantificación relativa, en base a los datos de los Ct obtenidos para cada uno de los genes, el resultado que se obtuvo fue una disminución de la expresión en los cultivos con silenciamiento, tanto del gen LPP como del gen ACTB, de un 49% y un 20% respectivamente. En el caso del TJP1 se produjo un aumento del 87% en el cultivo tratado respecto del control (Tabla 1).

Tabla 1. Cuantificación relativa de la expresión en los cultivos con silenciamiento respecto a las muestras control para los genes LPP (SIL-LPP), ACTB (SIL-ACTB) y TJP1 (SIL-TJP1).

Nombre muestra	CR
SIL-LPP	0,511075215
SIL-ACTB	0,797768824
SIL-TJP1	1,878115776

DISCUSIÓN

El análisis de expresión del gen *LPP* en los dos tipos celulares T84 y C2BBE1 disponibles, se realizó para comprobar si existía producto de dicho gen (mRNA) en alguno de ellos. Para tal fin, se utilizó el gen *RPLPO* como gen de control endógeno. Aunque con niveles menores que el gen control, se observó expresión del gen *LPP* y por tanto confirmó la validez de dichos tipos celulares para el estudio del mismo.

Respecto al posible efecto de la gliadina o sus derivados peptídicos en los niveles de expresión del gen *LPP*, existen estudios en los que se ha comprobado, como dichos compuestos han sido capaces de alterar los niveles de expresión de algunos genes que codifican para proteínas relacionadas con las uniones estrechas, tales como la zonulina, la ocludina, claudina 3 y 4 o la E-cadherina (Sander et al., 2005; Thomas et al., 2006). En el presente estudio, sin embargo, no se observaron cambios estadísticamente significativos entre los niveles de expresión del gen *LPP* en las células crecidas en los medios control y con BSA, respecto a las crecidas con gliadina. Lo cual podría estar indicando que la gliadina no tiene efecto sobre la expresión del gen de interés.

Por otra parte, aunque los resultados obtenidos indicarían que no existen diferencias significativas entre ninguno de los cultivos analizados, sí se observó cierta tendencia de aumento en la expresión del gen *LPP* en el cultivo con gliadina. Por tanto, sería conveniente realizar nuevas réplicas del estudio o modificar las condiciones de crecimiento (aumentar la cantidad de gliadina, variar el tiempo de exposición, ...) para, con una mayor cantidad de datos, comprobar si esa tendencia se confirmaría estadísticamente, con cambios significativos en los niveles de expresión o por el contrario los niveles se mantendrían igual.

En cualquier caso, el resultado obtenido, fue contrario al observado en biopsias de células intestinales de pacientes con EC, en las que el gen *LPP* está desregulado (Almeida et al., 2013). Dado que la secuencia del gen de estudio es la misma en pacientes con EC que en personas sanas, estaría indicando que existe algún mecanismo o mecanismos subyacentes (factores de transcripción, secuencias reguladoras, niveles de expresión de otros genes) que disminuyen los niveles de expresión del gen en las personas con esta enfermedad, no estando presentes en personas sanas.

Por último, se consiguió silenciar en un 49% la expresión del gen de interés y se observó una posible influencia en la expresión de los genes *ACTB* y *TJP1*.

Los resultados obtenidos para el gen *ACTB* en el cultivo con silenciamiento, mostraron una reducción del 20% en su expresión respecto al cultivo control. En cualquier caso, no se tuvieron en cuenta ni se consideraron significativos, ya que los datos del gen endógeno *RPLPO* de dos de las tres réplicas del cultivo con silenciamiento tuvieron que ser desechadas, al diferir claramente con los del resto del experimento. Se haría necesario, por tanto, realizar nuevas réplicas, para comprobar si realmente la disminución en la expresión del gen *LPP* afectaría negativamente a los niveles de expresión del gen

ACTB, lo que estaría indicando una posible relación entre estos dos genes, involucrados ambos en las uniones celulares.

Sin embargo, en el caso del gen *TJP1*, también involucrado en estas uniones, si se observó una posible relación con el gen *LPP*, ya que la expresión de *TJP1* aumentó en un 87% en el cultivo con silenciamiento frente al control. Aunque ninguno de los datos obtenidos fue desechado en este caso y por tanto el resultado obtenido fue más fiable, sólo se dispuso de una réplica de los cultivos para extraer el RNA y analizarlo. Es por ello que, para validar los resultados obtenidos, sería conveniente realizar nuevas réplicas que aumentasen el número de datos disponibles y de este modo, mediante significaciones estadísticas, establecer o no estas posibles relaciones.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a José Ramón, mi director de TFG, por su ayuda y su pragmatismo a la hora de dirigir este trabajo, que ha hecho más fácil y llevadero la ejecución del mismo y por haberme dado, además, la oportunidad de participar como alumna interna en el laboratorio. Quiero agradecer también su ayuda a los integrantes de su grupo de investigación. Gracias a Leti, Irati, Izortze, Nora, Koldo y en especial a Amaia, por su disposición siempre amable y con una sonrisa y por el gran ambiente de trabajo que han creado. Ha sido un placer haber podido trabajar con todos vosotros, gracias por ayudarme en mi aprendizaje.

BIBLIOGRAFÍA

- Abadie V. et al. Integration of Genetic and Immunological Insights into a Model of Celiac Disease Pathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 2001; 29: 493-525.
- Almeida R. et al. Fine mapping of the celiac disease-associated *LPP* locus reveals a potential functional variant. *Human Molecular Genetics.* 2013; 20:1-9.
- Anderson R.P. et al. In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. *Nat Med.* 2000; 6(3): 337-42.
- Arentz-Hansen H. et al. The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J Exp Med.* 2000; 191(4): 603-12.
- Arentz-Hansen H. et al. Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology.* 2002; 123(3): 803-9.
- Arranz E. et al. Inmunopatogenia de la enfermedad celíaca. En Rodrigo L. y Peña A.S., editores. *Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca.* Barcelona, España: OmniaScience. 2012; p.123-149.
- Ballabriga A., Kretschmer N. eds. Nueva York: Raven Press. 1991; 105-12.
- Cataldo F. et al. Celiac disease in the developing countries: a new and challenging public health problem. *World J Gastroenterol.* 2007; 13: 2153-9.
- Clemente M.G. et al. Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signaling involved in intestinal barrier function. *Gut.* 2003; 52(2): 218-23.
- Cummins A.G., Roberts-Thomson I.C.. Prevalence of celiac disease in the Asian-Pacific region. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009; 24(8): 1347-51.
- de Kauwe A.L. et al. Resistance to celiac disease in humanized HLA-DR3-DQ2-transgenic mice expressing specific anti-gliadin CD4+ T cells. *J Immunol.* 2009; 182: 7440-50.

- De Stefano D. et al. The role of NK-kappaB, IRF-1, and STAT-1alpha transcription factors in the iNOS gene induction by gliadin and IFN-gamma in RAW 264.7 macrophages. *J Mol Med (Berl)*. 2006; 84(1): 65-74.
- Di Sabatino A. et al. Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease. *Gut*. 2006; 55(4): 469-77.
- Di Sabatino A. et al. Coeliac disease. *Lancet*. 2009; 373: 1480-93.
- Dicke W.K. et al. Coeliac disease. II. The presence in wheat of a factor having a deleterious effect in cases of coeliac disease. *Acta Paediatr*. 1953 ; 42 : 34-42.
- Dieterich W. et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med*. 1997; 3 (7): 797-801.
- Dubé C. et al. The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk Western European Populations: a systematic review. *Gastroenterology*. 2005; 128: S57-67.
- Dubois P.C. et al. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat Genet*. 2010; 42: 295--□302. Erratum in: *Nat Genet*. 2010; 42: 465.
- Ebert E.C. IL-15 converts human intestinal intraepithelial lymphocytes to CD94 producers of IFN-gamma and IL-10, the latter promoting Fas ligand-mediated cytotoxicity. *Immunology*. 2005; 115(11): 118-26.
- Ebert L. et al. Cloning of human full open reading frames in Gateway(TM) system entry vector (pDONR201). Submitted (JUN-2004) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
- Ellis H.J., Ciclitira P.J. In vivo gluten challenge in celiac disease. *Can J gastroenterol*. 2001; 15(4): 243-7.
- Feighery C. Fortnightly review: celiac disease. *BMJ*. 1999; 319: 236-9.
- Fernández-Jiménez, N. Aspektu berriak eritasun zeliakoaren genetikan: Kopia kopuru aldaerak, metilazioa eta korregulazioa NFkB-rekin erlazionatutako geneetan. 2014. Tesi Doktorala, Euskal Herriko Unibertsitatea.
- Fernández-Jiménez, N. et al. Genetic Markers in Celiac Disease. In Rodrigo L. and Peña A.S., editors. *Celiac Disease and Non-Celiac Gluten Sensitivity*. Barcelona, Spain: Omnia-Science; 2014; p. 103-121.
- García Nieto V.M. Historia de la enfermedad celíaca. En Rodrigo L. y Peña A.S., editores. *Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca*. Barcelona, España: OmniaScience; 2013; p.45-59.
- Greco L. et al. The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut*. 2002; 50: 624-8.
- Hue S. et al. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity*. 2004; 21(3): 367-77.
- Hunt K.A. et al. Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response. *Nat Genet*. 2008; 40: 395-402.
- Husby S. et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012; 54: 136-60.
- Kumar V. et al. Systematic annotation of celiac disease loci refines pathological pathways and suggests a genetic explanation for increased interferon-gamma levels. *Human Molecular Genetics*. 2014; 19: 1-13.
- Leon F. et al. Cytokine production by intestinal intraepithelial lymphocyte subsets in celiac disease. *Dig Dis Sci*. 2005; 50(3): 593-600
- Ludwig H. et al. Association of HL*A1 and HL*A8 with childhood celiac disease. *Z Immunitätsforsch Exp Klin Immunol*. 1973; 146: 158-67.
- Lundin K.E. et al. Gliadin-specific, HLA-DQ(alpha 1*0501,beta 1*0201) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. *J Exp Med*. 1993; 178: 187-96.
- Maiuri L. et al. Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology*. 2000; 119(4): 996-1006.
- Maki M. The humoral immune system in celiac disease. *Baillieres Clin Gastroenterol*. 1995; 9: 231-49.
- Maki M. et al. Coeliac disease. *Lancet*. 1997; 349: 1755-9.
- Marsh M.N. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity('celiac sprue'). *Gastroenterology*. 1992; 102(1): 330-54.
- Martin-Pagola A. et al. MICA response to gliadin in intestinal mucosa from celiac patients. *Immunogenetics*. 2004; 56(8): 549-54.
- Mattei F. et al. IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation. *J Immunol*. 2001; 167(3): 1179-87.

- Matysiak-Budnik T. et al. Alterations of the intestinal transport and processing of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology*. 2003; 125(3): 696-707.
- Mention J.J. et al. Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology*. 2003; 125(3): 730-45.
- Meresse B. et al. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NGK2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity*. 2004; 21(3): 357-66.
- Molberg O. et al. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med*. 1998; 4(6): 713-7.
- Monteleone G. et al. Role of interferon alpha in promoting T helper cell type 1 responses in the small intestine in celiac disease. *Gut*. 2001; 48(3): 425-9.
- Monsuur A.J. et al. Myosin IXB variant increases the risk of celiac disease and points toward a primary intestinal barrier defect. *Nat. Genet*. 2005; 37: 1341-44.
- Mowat A.M. Anatomical basis of tolerance and immunity to infection. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3(4): 331-41.
- Nilsen E.M. et al. Gluten induce an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. *Gastroenterology*. 1998; 115(3): 551-63.
- Ohteki T. et al. Critical role of IL-15-IL-15R for antigen-presenting cell functions in the innate immune response. *Nat Immunol*. 2001; 2(12): 1138-43.
- Ouaz F. et al. Dendritic cell development and survival require distinct NF-kappaB subunits. *Immunity*. 2002; 16(2): 257-70.
- Pérez Villavicencio A. et al. Enfermedad Celíaca en China y Centroamérica. En Rodrigo L. y Peña A.S., editores. *Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca*. Barcelona, España: OmniaScience; 2013; p.61-74.
- Petit M.M. et al. *LPP*, an actin cytoskeleton protein related to zyxin, harbors a nuclear export signal and transcriptional activation capacity. *Mol. Biol. Cell*. 2000; 11: 117-129.
- Piper J.L. et al. Effect of propyl endopeptidase on digestive-resistant gliadin peptides in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004; 311(1): 213-9.
- Ploski R. et al. On the HLA-DQ(alpha 1*0501, beta 1*0201)-associated susceptibility in celiac disease: a possible gene dosage effect of DQB1*0201. *Tissue Antigens*. 1993; 41: 173-7.
- Raki M. et al. A unique dendritic cell subset accumulates in the celiac lesion and efficiently activates gluten-reactive T cells. *Gastroenterology*. 2006; 131(2): 428-38.
- Rossi E. *Pediatric Gastroenterology*. En: *History of Pediatrics 1850-1950*. Nichols Jr. BL.
- Royer M. et al. Biopsia duodenal por aspiración bajo control radioscópico. *Prensa Med Argentina*. 1955; 42: 2515-9.
- Rueda B. et al. Association study of functional genetic variants of innate immunity related genes in celiac disease. *BMC Med Genet*. 2005; 6: 29.
- Sander G.R. et al. Rapid disruption of intestinal barrier function by gliadin involves altered expression of apical junctional proteins. *FEBS Letters*. 2005; 579: 4851-4855.
- Schuppan D. et al. Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterology*. 2009; 137: 1912-33.
- Shiner M. Duodenal biopsy. *Lancet*. 1956; 270: 17-9.
- Sollid L.M. et al. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J Exp Med*. 1989; 169: 345-50.
- Sollid L.M. et al. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology*. 1993; 105: 910-22. Erratum in: *Gastroenterology* 1994; 106: 1133.
- Stenman S.M. et al. Secretion of celiac disease autoantibodies after in vitro gliadin challenge is dependent on small-bowel mucosal transglutaminase 2-specific IgA deposits. *BMC Immunol*. 2008; 9: 6.
- Thomas K.E. et al. Gliadin Stimulation of Murine Macrophage Inflammatory Gene Expression and Intestinal Permeability Are MyD88-Dependent: Role of the Innate Immune Response in Celiac Disease. *J Immunol*. 2006; 176: 2512-2521.
- Trynka G. et al. Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nat Genet*. 2011; 43: 1193-201.
- van Belzen M.J. et al. Defining the contribution of the HLA region to cis DQ2-positive coeliac disease patients. *Genes Immun*. 2004; 5: 215-20.
- van de Wal Y. et al. Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *J Immunol*. 1998; 161(4): 1585-8.
- van Heel D.A. et al. A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nat Genet*. 2007; 39: 827-9.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla suplementaria 1. Resultados obtenidos en la RT-qPCR de los tres cultivos celulares analizados. Aparecen agrupados por el número de réplica. C-LLP (muestra de células crecidas con medio control); BSA-LPP (muestra de células crecidas con medio control y BSA); G-LPP (muestra de células crecidas con medio control y gliadina)

Nº réplica	Nombre muestra	Gen analizado	Ct (ciclo)
1	C-LPP	LPP	23,24
1	C-LPP	RPLPO	21,27
1	C-LPP	LPP	23,40
1	C-LPP	RPLPO	20,88
1	BSA-LPP	LPP	23,17
1	BSA-LPP	RPLPO	21,72
1	BSA-LPP	LPP	23,76
1	BSA-LPP	RPLPO	21,70
1	G-LPP	LPP	23,17
1	G-LPP	RPLPO	22,03
1	G-LPP	LPP	23,13
1	G-LPP	RPLPO	21,47
2	C-LPP	LPP	23,21
2	C-LPP	RPLPO	21,31
2	C-LPP	LPP	23,41
2	C-LPP	RPLPO	21,54
2	BSA-LPP	LPP	23,23
2	BSA-LPP	RPLPO	21,64
2	BSA-LPP	LPP	23,25
2	BSA-LPP	RPLPO	20,86
2	G-LPP	LPP	22,93
2	G-LPP	RPLPO	21,93
2	G-LPP	LPP	23,28
2	G-LPP	RPLPO	21,42
3	C-LPP	LPP	23,53
3	C-LPP	RPLPO	21,37
3	C-LPP	LPP	23,32
3	C-LPP	RPLPO	21,26
3	BSA-LPP	LPP	23,16
3	BSA-LPP	RPLPO	21,44
3	BSA-LPP	LPP	23,41
3	BSA-LPP	RPLPO	21,29
3	G-LPP	LPP	23,41
3	G-LPP	RPLPO	21,21
3	G-LPP	LPP	23,36
3	G-LPP	RPLPO	20,40

Tabla suplementaria 2. Resultados de la RT-qPCR correspondiente a la prueba de silenciamiento para las muestras control (CL-LPP, CL-ACTB y CL-TJP1) y de silenciamiento (SIL-LPP, SIL-ACTB y SIL-TJP1).

Nombre muestra	Gen analizado	Ct (ciclo)	Ct promedio (ciclo)
CL-LPP	LPP	26,69	26,46 ± 0,39
CL-LPP	RPLPO	24,14	23,84± 0,43
CL-LPP	LPP	26,68	
CL-LPP	RPLPO	24,02	
CL-LPP	LPP	26,01	
CL-LPP	RPLPO	23,35	
SIL-LPP	LPP	27,28	27,29± 0,16
SIL-LPP	RPLPO	23,68	23,70± 0,12
SIL-LPP	LPP	27,13	
SIL-LPP	RPLPO	23,59	
SIL-LPP	LPP	27,45	
SIL-LPP	RPLPO	23,82	
CL_ACTB	ACTB	19,42	19,34± 0,08
CL_ACTB	RPLPO	24,53	24,49±0,05
CL_ACTB	ACTB	19,26	
CL_ACTB	RPLPO	24,46	
CL_ACTB	ACTB	19,34	
CL_ACTB	RPLPO	27,79	
SIL-ACTB	ACTB	19,37	19,73± 0,36
SIL-ACTB	RPLPO	24,20	24,20± 0,00
SIL-ACTB	ACTB	19,73	
SIL-ACTB	RPLPO	27,54	
SIL-ACTB	ACTB	20,09	
SIL-ACTB	RPLPO	28,88	
CL-TJP1	TJP1	28,49	28,14± 0,43
CL-TJP1	RPLPO	25,26	24,50± 1,01
CL-TJP1	TJP1	28,27	
CL-TJP1	RPLPO	23,34	
CL-TJP1	TJP1	27,66	
CL-TJP1	RPLPO	24,87	
SIL-TJP1	TJP1	27,41	27,70± 0,45
SIL-TJP1	RPLPO	25,09	24,96± 0,12
SIL-TJP1	TJP1	27,48	
SIL-TJP1	RPLPO	24,89	
SIL-TJP1	TJP1	28,22	
SIL-TJP1	RPLPO	24,89	