



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN ENFERMOS CELIACOS Y
SENSIBLES AL GLUTEN NO CELIACOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MORALES CORONA RUTH

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ANTONIA ISABEL CASTILLO RODAL
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. BERTHA JOSEFINA ESPINOZA GUTIÉRREZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. LUIS GUILLERMO LLORENTE PETERS
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"

MÉXICO, CD. MX., ABRIL, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 12 de octubre de 2015, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **MORALES CORONA RUTH** con número de cuenta **513023778**, con la tesis titulada **"CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN ENFERMOS CELIACOS Y SENSIBLES AL GLÚTEN NO CELIACOS"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ANTONIA ISABEL CASTILLO RODAL**:

Presidente: DR. LUIS GUILLERMO LLORENTE PETERS
Vocal: DR. LUIS FEDERICO USCANGA DOMÍNGUEZ
Secretario: DRA. LETICIA MORENO FIERROS
Suplente: DRA. MARÍA GLORIA SOLDEVILA MELGAREJO
Suplente: DRA. BERTHA JOSEFINA ESPINOZA GUTIÉRREZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 15 de febrero de 2016

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos

- ∅ Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

- ∅ Al apoyo recibido por CONACYT (CVU/Becario): **508693/288728**.

- ∅ Al apoyo recibido por del Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” con el proyecto: “Respuesta inmune en personas con intolerancia al gluten, un estudio comparativo en sujetos con Enfermedad Celiaca (EC) e Intolerantes al Gluten no Celiacos (IGNC)”, clave GAS-1298-14/15-1.

- ∅ A los miembros de mi Comité Tutor
 - Dra. Antonia Isabel Castillo Rodal
 - Dra. Bertha Josefina Espinoza Gutiérrez
 - Dr. Luis Guillermo Llorente Peters

Agradecimientos a título personal

- ⊗ Me gustaría agradecer a mi Asesora de Tesis la Dra. Antonia Isabel Castillo Rodal por sus conocimientos, orientación, persistencia, paciencia y motivación; ya que han sido fundamentales para mi formación.

- ⊗ Al Dr. Luis Federico Uscanga Domínguez por permitirnos la colaboración con el Depto. de Gastroenterología del INCMNSZ, haciendo posible la realización este protocolo de investigación.

- ⊗ A la Dra. Yolanda López Vidal por permitirme ser parte de su grupo de investigación y facilitarme todos los medios a su alcance para el desarrollo de mi proyecto de maestría.

- ⊗ A la Dra. Janette Furuzawa Carballada por su apoyo para realización de trabajo experimental en su laboratorio, así como el aporte de su conocimiento, experiencia y capacidad para el análisis de los resultados.

- ⊗ A la Biól. Yuriko Jiménez Kawaguchi por ser mi amiga y compañera en la realización de este proyecto.

- ⊗ A la Dra. Yeraldín Esquivel Álvarez por su amistad y todo su apoyo durante la realización de los experimentos de IHQ.

- ⊗ Al Dr. José Fernando Castro Gómez por su apoyo en la fase clínica para la realización del protocolo de investigación.

- ⊗ A la Sria. Verónica Álvarez Durán por su ayuda en todos los trámites administrativos realizados en el INCMNSZ.

∅ A mis amigos del laboratorio: M. en C. Tania Dalet Varela Salinas, Dra. Claudia Mayoral Terán, Dra. Marisa Cruz Aguilar y Dr. Luis Alberto Salazar López; por coincidir en un mismo lugar en el mismo momento para compartir grandes experiencias. ¡Gracias amigos!

Dedicatoria

- ∅ A mis padres: Lic. Roberto Morales Juárez y Profra. Ma. Socorro Corona Hernández por ser mi guía para llegar a este punto de mi carrera. Que con su ejemplo, dedicación y palabras de aliento siempre me apoyaron.

- ∅ A mi hermano Lic. Roberto César Morales Corona por estar siempre a mi lado, apoyarme como un amigo y ser un gran ejemplo para mí.

- ∅ A Oscar Gutiérrez Bello por ser uno de mis principales impulsos durante este proyecto, por su apoyo constante y su amor incondicional. Por creer en mí, ser mi compañero inseparable, fuente de calma y consejo en todo momento. Por brindarme su comprensión, cariño y amor.

*La vida no es un problema a ser resuelto,
sino una realidad a experimentar*

Soren Kierkegaard

Índice

Lista de figuras y tablas.....	i
Lista de abreviaturas.....	iii
Resumen.....	1
Abstract.....	3
1. Introducción.....	5
1.1. Enfermedad celiaca.....	5
1.1.2. Prevalencia.....	6
1.1.3. Factores de riesgo.....	6
1.1.4. Fisiopatología.....	7
1.1.5. Función inmune.....	9
1.2. Sensibilidad al gluten no celiaca.....	10
1.3. Tejido linfoide asociado a intestino y tolerancia oral.....	12
1.4. Subpoblaciones de linfocitos T en la EC y la SGNC.....	14
2. Antecedentes.....	19
3. Justificación.....	21
4. Hipótesis.....	22
5. Objetivos.....	23
5.1. Objetivo general.....	23
5.2. Objetivos particulares.....	23
6. Metodología.....	24
6.1. Población.....	24
6.2. Obtención de linfocitos a partir de biopsias duodenales.....	25
6.3. Aislamiento de CMSP de pacientes.....	27
6.4. Análisis de las poblaciones linfocitarias por citometría de flujo.....	27
6.4.1. Tinción extracelular de los linfocitos.....	28
6.4.2. Tinción intracelular de los linfocitos.....	29
6.5. Análisis de las los linfocitos por citometría de flujo.....	29
6.6. Inmunohistoquímica.....	30
6.6.1. Protocolo para inmunohistoquímica.....	31

6.7. Análisis estadístico de los resultados.....	31
6.7.1. Datos obtenidos por de citometría de flujo.....	31
6.7.2. Datos obtenidos por inmunohistoquímica.....	32
7. Resultados.....	33
7.1. Subpoblaciones linfocitarias en sangre e intestino.....	33
7.1.1. Análisis de las muestras por citometría de flujo.....	33
7.2. Detección de citocinas en tejido duodenal por IHQ.....	36
7.2.1. Citocinas proinflamatorias en la respuesta inmune de la EC y la SGNC.....	36
7.2.2. Citocinas anti-inflamatorias en la respuesta inmune de EC y la SGNC.....	43
7.2.3. Citocinas fibrogénicas en la respuesta inmune de la EC y la SGNC	44
8. Discusión.....	45
9. Conclusiones.....	53
10.Literatura citada.....	54

Lista de figuras y tablas

Fig. 1. Micrografía de barrido e histología del epitelio intestinal normal y de paciente con EC.....	5
Fig. 2. Prevalencia a nivel mundial de la EC.....	6
Fig. 3. Fisiopatología de la EC.....	8
Fig. 4. Desórdenes relacionados al gluten.....	10
Fig. 5. Sistema inmune asociado a la mucosa intestinal.....	13
Fig. 6. Regulación de la polarización al linaje Th17.....	17
Fig. 7. Porcentaje de expresión del marcador CD4 en linfocitos.....	33
Fig. 8. Porcentaje de expresión del factor de transcripción Foxp3 en linfocitos.....	34
Fig. 9. Porcentaje de expresión del factor de transcripción T-bet en linfocitos.....	34
Fig. 10. Porcentaje de expresión del factor de transcripción ROR- γ t en linfocitos.....	35
Fig. 11. Porcentaje de producción de IFN- γ en linfocitos.....	35
Fig. 12. Porcentaje de producción de IL-17A en linfocitos.....	36
Tabla 1. Anticuerpos utilizados en los experimentos de citometría de flujo...	28
Tabla 2. Anticuerpos utilizados en los experimentos de inmunohistoquímica	30
Tabla 3. Valores de detección de IL-1 β en tejido duodenal.....	37
Tabla 4. Valores de detección de IL-2 en tejido duodenal.....	37
Tabla 5. Valores de detección de IL-6 en tejido duodenal.....	38
Tabla 6. Valores de detección de IL-8 en tejido duodenal.....	38
Tabla 7. Valores de detección de IL-12p40 en tejido duodenal.....	39
Tabla 8. Valores de detección de IL-15 en tejido duodenal.....	39
Tabla 9. Valores de detección de IL-17A en tejido duodenal.....	40
Tabla 10. Valores de detección de IL-21 en tejido duodenal.....	40
Tabla 11. Valores de detección de IL-22 en tejido duodenal.....	41
Tabla 12. Valores de detección de IL-23 en tejido duodenal.....	41

Tabla 13. Valores de detección de IFN- γ en tejido duodenal.....	42
Tabla 14. Valores de detección de TNF- α en tejido duodenal.....	42
Tabla 15. Valores de detección de IL-4 en tejido duodenal.....	43
Tabla 16. Valores de detección de IL-10 en tejido duodenal.....	43
Tabla 17. Valores de detección de TGF- β 1 en tejido duodenal.....	44

Lista de abreviaturas

Anti-AGA	anti-gliadina
Anti-DGP	anti-gliadina desaminada
Anti-EMA	anti-endomisio
Anti-tTG	anti-transglutaminasa tisular
APC	Célula presentadora de antígeno
Ca ⁺⁺	Calcio
CD	Célula dendrítica
CLDN4	Claudina 4
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
DAB	Deaminobencidina
DLG	Dieta libre de gluten
EC	Enfermedad celiaca
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epitelial
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epitelial
Ep	Epitelio
FODMAPs	Oligo- di- y mono- sacáridos fermentables y polioles
g	Gramos
GALT	Tejido linfoide asociado a intestino
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HBSS	Hank's buffer salt solution
HLA	Antígeno leucocitario humano
IFN- γ	Interferón gama
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IL-	Interleucina-
IL-23R	Receptor de IL-23
ILFs	Folículos linfoides aislados
iTreg	T regulador inducible

LA/MA	Lactulosa/Manitol
LIE	Linfocitos intraepiteliales
LP	Lamina propria
LSP	Linfocitos de sangre periférica
MFI	Intensidad media de fluorescencia
Mg ⁺⁺⁺	Magnesio
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MLN	Ganglio linfático mesentérico
mm	milímetros
MO	Macrófago
nTreg	T regulador natural
PBS	Buffer de fosfatos
PP	Placas de Peyer
ROR- γ t	Receptor huérfano relacionado al ácido retinoico gama t
SAID	Síndrome de absorción intestinal deficiente
SFB	Suero fetal bovino
SGNC	Sensibilidad al gluten no celiaca
STAT	Transductor de señales y activador de la transcripción
Tc	Linfocito T citotóxico
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante beta 1
Th	Linfocito T cooperador
TLR2	Receptor tipo Toll 2
Treg	T regulador

Resumen

La Enfermedad Celiaca (EC) afecta la función del intestino delgado en pacientes predispuestos genéticamente y se desencadena por el consumo de gluten, una proteína presente en el trigo y otros cereales. Hasta el momento la única terapia disponible para la EC es la dieta libre de gluten (DLG), sin embargo no es la única entidad clínica que responde a este tratamiento.

Recientemente se ha identificado a otro grupo de pacientes que mejoran considerablemente con la exclusión del gluten de su dieta, comparten el cuadro clínico de los celíacos y sólo un marcador serológico positivo, los anticuerpos anti-gliadina (anti-AGA). A esta patología se le denomina Sensibilidad al Gluten no Celiaca (SGNC), a diferencia de la EC el intestino de los sensibles al gluten no presenta lesiones a nivel de mucosa y carece del elemento autoinmune. El diagnóstico de la SGNC es complicado debido a las características clínicas compartidas con la EC así como la carencia de marcadores específicos de laboratorio, esto ha impedido un cálculo apropiado de su prevalencia así como la caracterización de su fisiopatología.

El objetivo de nuestro trabajo fue evaluar las respuestas linfocitarias que se generan en el proceso inflamatorio de individuos con EC y SGNC. El estudio incluyó 32 pacientes: 15 con EC, 9 con SGNC y 8 controles. De los cuales se obtuvieron muestras de sangre periférica y tejido duodenal para la identificación por citometría de flujo de poblaciones de linfocitos T cooperadores: Th1, Th17 y Treg utilizando marcadores de superficie, factores de transcripción y producción de citocinas; así como la detección de citocinas implicadas en la diferenciación y mantenimiento de los linajes Th1, Th17 y Treg en cortes de tejido duodenal por inmunohistoquímica.

Por citometría de flujo detectamos una mayor expresión del factor de transcripción ROR- γ t y producción de IL-17A, ambos marcadores de linfocitos Th17, en sangre periférica y tejido duodenal de pacientes con EC. Mientras que ningún marcador tuvo una expresión significativa para el grupo SGNC. En la detección por IHQ en tejido duodenal encontramos una producción significativa de citocinas

proinflamatorias en el grupo de EC: IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, IFN- γ y TNF- α . También hubo una producción significativa de la citocinas anti-inflamatoria IL-10 así como de la citocina fibrogénica TGF- β 1. En el grupo de SGNC también hubo una expresión significativa de citocinas proinflamatorias: IL-1 β , IL-2, IL-12, IL-15, IL-21, IL-22, IL-23 y TNF- α ; respecto del grupo control, pero siempre por debajo de la producción detectada en los pacientes celíacos. Cabe resaltar que la producción de IL-10 y TFG- β 1 fue superior en los SGNC respecto del grupo control y mostró una tendencia de mayor producción comparado con el grupo de EC.

Se concluye que en el proceso inflamatorio de la EC los linfocitos Th17 participan de manera activa en la patogénesis. En la SGNC fue imposible identificar un fenotipo linfocitario dominante, sin embargo se produjeron citocinas proinflamatorias relacionadas al desarrollo de mecanismos de inmunidad adaptativa. Destaca el aumento en la producción de TFG- β 1, citocina relacionadas con la regulación de respuestas inflamatorias lo que podría brindarle un efecto inmunosupresor reduciendo el nivel de inflamación en esta patología.

Abstract

Celiac disease (CD) affects the function of the small intestine in genetically predisposed patients and is triggered by the ingestion of gluten, a protein found in wheat and other cereals. So far the only available therapy for CD is the gluten-free diet (GFD), however is not the single entity that responds to this treatment.

Recently it has been identified another group of patients who improved considerably with the exclusion of gluten from their diet, they share some clinical features with celiac patients and only a positive serological marker, anti-gliadin (anti-AGA) antibodies. This pathology has been classified Non-Celiac Gluten Sensitivity (NCGS), unlike intestine of CD patients NCGS doesn't cause injuries in the intestinal mucosa and it lacks of autoimmune features. The diagnosis of NCGS it's complicated because of its resemblance with EC and the lack of specific laboratory markers, this has prevented a proper calculation of the prevalence and characterization of its pathogenesis.

The aim of our study was to evaluate the lymphocyte responses generated in the inflammatory process of individuals with CD and NCGS. The study included 32 patients: 15 with CD, 9 with NCGS and 8 controls. We collected peripheral blood samples and duodenal tissue for identification of T helper cell populations: Th1, Th17 and Treg; using surface markers, transcription factors and cytokine production; and for the detection of cytokines involved in differentiation and maintenance of Th1, Th17 and Treg lineages in duodenal tissue sections by immunohistochemistry.

By flow cytometry we detect increased expression of the transcription factor ROR- γ t and IL-17A, both markers of Th17 cells in peripheral blood and duodenal tissue from patients with CD. While for NCGS we were unable to detect the expression of a significant marker. IHC detection in duodenal tissue found in a significant production of proinflammatory cytokines in the EC group: IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, IFN- γ and TNF- α . There was also a significant production of anti-inflammatory cytokines IL-10 and the fibrogenic cytokine TGF- β 1. In NCGS group there was also a significant expression of

proinflammatory cytokines: IL-1 β , IL-2, IL-12, IL-15, IL-21, IL-22, IL-23 and TNF- α ; with respect to the control group, but always below the production detected in celiac patients. It should be noted that the production of IL-10 and TGF- β 1 in SGNC was higher in respect of the control group and showed a trend of higher production compared to the EC group.

We concluded that Th17 cells are actively involved in the pathogenesis of the CD. In SGNC was impossible to identify a dominant lymphocyte phenotype, however pro-inflammatory cytokines related to the development of adaptive immunity mechanisms occurred. It's remarkable the increased production of TGF- β 1, cytokine involved in the regulation of inflammatory responses which could provide an immunosuppressive effect reducing the level of inflammation in this disease.

1. Introducción

La enfermedad celiaca (EC) y la sensibilidad al gluten no celiaca (SGNC) son desórdenes relacionados con el consumo de gluten, una proteína presente en el trigo y algunos cereales (Gasbarrini y Mangiola, 2014). Estos padecimientos generan síntomas intestinales y extraintestinales, sin embargo sólo en la EC se ha descrito un papel preponderante de respuestas efectoras de linfocitos T en su fisiopatología, a diferencia de la SGNC de la que se desconocen los mecanismos que la ocasionan (Caio, *et al.*, 2014).

Enfermedad celiaca

La enfermedad celiaca (EC) es una enteropatía crónica que afecta al intestino delgado en personas que poseen el haplotipo HLA-DQ2 o DQ8 (Fig. 1). Existen otros factores de riesgo muy relacionados con genes que codifican para elementos de la respuesta inmune. (Gujral, *et al.*, 2012). La EC se caracteriza por una respuesta inmunológica intensa, atrofia de vellosidades intestinales, la presencia de anticuerpos anti-gliadina (AGA), anticuerpos anti-endomisio (EMA) y anticuerpos anti-transglutaminasa (tTG) en sujetos predispuestos genéticamente (Bai, *et al.*, 2012). La sintomatología de la EC se manifiesta principalmente por síndrome de absorción intestinal deficiente (SAID), distensión y dolor abdominal, salpullido, eczema, dolor de cabeza y articulaciones, anemia, fatiga, depresión y en los casos avanzados desnutrición secundaria a la deficiente absorción de nutrientes (Vargas Pérez, *et al.*, 2004).

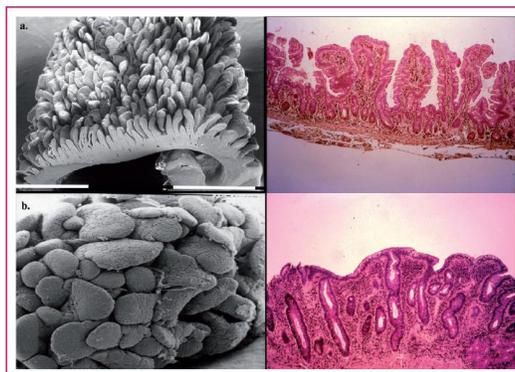


Fig. 1. Micrografía de barrido e histología que muestran la citoarquitectura normal del epitelio absorbente del intestino delgado (a) y la atrofia vellosa subtotal asociada con hiperplasia de las criptas (b) (Gasbarrini y Mangiola, 2014).

1.1.2 Prevalencia

En el pasado la prevalencia de la EC fue subestimada, actualmente es reconocida como uno de los desórdenes gastrointestinales más importantes a nivel mundial. Con el desarrollo de técnicas de detección más sensibles y específicas se calcula que la prevalencia a nivel mundial es del 0.5%-1% (Kenrick y Day, 2014) (Fig. 2). En México un estudio en un grupo de donadores de sangre voluntarios sanos, reportó una prevalencia de anticuerpos anti-tTG IgA del 2.6% (27 de 1009) (Remes-Troche, *et al.*, 2006). Sin embargo en un análisis posterior utilizando anticuerpos anti-EMA como prueba confirmatoria, la prevalencia fue de 1:164 casos (0.7%) (Remes-Troche, *et al.*, 2012).

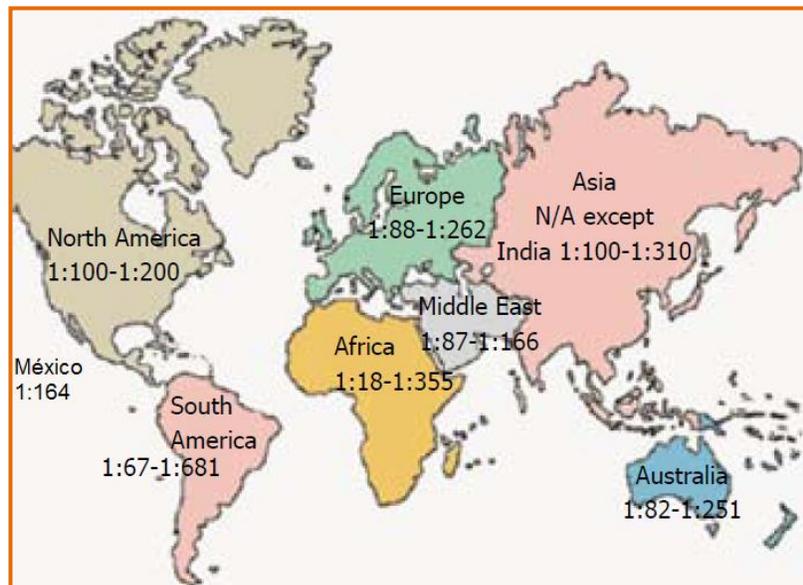


Fig. 2. Prevalencia a nivel mundial de la EC. El valor de prevalencia reportado para México (0.7%), es similar a lo reportado para otras poblaciones. (Modificado de Gujral, *et al.*, 2012).

1.1.3. Factores de riesgo

El desarrollo de la EC es multifactorial, comprende factores genéticos, inmunes y ambientales. El principal factor de riesgo se encuentra en los genes que codifican para moléculas presentadoras de antígeno de clase II HLA-DQ2 y HLA-DQ8; otros genes codificados en el locus de HLA como *MICA*, *MICB* y *TNF* también impactan en la susceptibilidad a esta patología, genes fuera del locus del HLA, como lo son

TNFRS, *SOCS1*, *CTL4*, *CD28*, *ICOS*; están altamente relacionados con la respuesta inmune en procesos como: actividad de receptores a quimiocinas, unión de citocinas, activación y diferenciación de linfocitos T (Abadie, *et al.*, 2011).

El factor ambiental es el consumo de gluten, un antígeno alimentario presente en el trigo y otros cereales como la cebada y el centeno. El gluten es la fracción protéica del trigo y está compuesta de gliadinas y gluteninas de las cuales la gliadina presenta secuencias de aminoácidos ricas en prolinas y glutaminas que le permiten al gluten presentar una resistencia a la degradación por los ácidos gástricos, pancreáticos así como por las enzimas digestivas del borde en cepillo (Kupfer y Jabri, 2012).

1.1.4. Fisiopatología

La fisiopatología se inicia cuando el péptido del gluten (19 mer) estimula el sistema inmune a liberar IL-15 por células epiteliales y células dendríticas (CD). IL-15 afecta las uniones estrechas de las células epiteliales incrementando la permeabilidad misma que actúa sobre linfocitos intraepiteliales (LIE) que liberan IFN- γ y en linfocitos citotóxicos. Por otro lado, el péptido 33 mer atraviesa la capa de la mucosa intestinal hacia la parte basal y se acumulan en la lámina propia donde son presentados por las CD a los linfocitos T (Fig. 3). Se sabe que la unión de péptidos de gliadina al receptor CXCR3 expresado en las células del epitelio intestinal, induce la liberación de concentraciones altas de zonulina produciendo incremento en la permeabilidad intestinal por alteración de uniones estrechas. Adicionalmente, los péptidos pueden atravesar las células epiteliales mediante la unión con la IgA secretoria a través del receptor de transferrina CD71 (Gugral, *et al.*, 2012).

Los péptidos del gluten presentan un alto contenido en residuos de glutamina que sufren desaminación por la enzima transglutaminasa tisular (tTG) (Sollid y Jabri, 2011), lo que les produce un cambio de carga neutra a negativa, haciéndolos más afines a la unión con moléculas del HLA-DQ2 y DQ8, expresados en células presentadoras de antígeno. Las secuencias de gliadina así como complejos de péptidos más la tTG activan a linfocitos T CD4+ gluten específicos en lámina

propia secretando IFN- γ , IL-10, IL-21 así como IL-17-A (Briani, *et al.*, 2008).

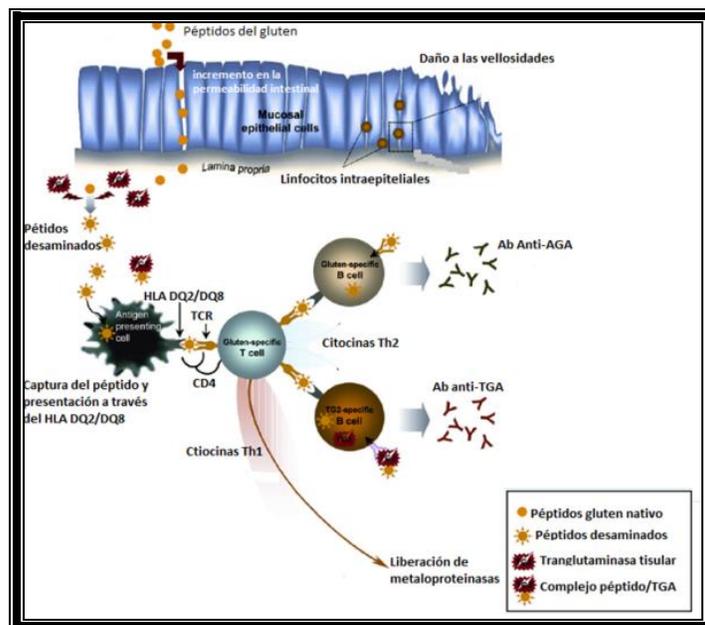


Fig. 3. Fisiopatología de la EC. Los péptidos del gluten atraviesan la capa epitelial hacia la zona basal en lamina propia en donde sufren desaminación por la enzima transglutaminasa tisular (tTG). Estos péptidos y complejos péptido-tTG son reconocidos por moléculas del HLA DQ2/DQ8 en APC y presentados a linfocitos T CD4+ vírgenes. Los linfocitos activados producen grandes cantidades de citocinas proinflamatorias, incrementando la citotoxicidad de LIE y células NK así como la producción de Ab anti-AGA y anti-tTG generando daños a las vellosidades intestinales (Modificado de Briani, *et al.*, 2008).

Está reportado que los linfocitos se diferencian hacia el linaje Th1 y son responsables de la producción de anticuerpos dirigidos contra péptidos derivados del gluten, contra la tTg y complejos tTg-gliadina; lo que cataloga a la EC como una patología autoinmune pues se reconoce a la tTg, un componente propio del organismo, como un elemento extraño. La presencia de autoanticuerpos IgA dirigidos contra una proteína propia, es un elemento principal del diagnóstico de la EC (Comerford, *et al.*, 2014).

1.1.5. Función inmune

Debido a que la EC es un desorden autoinmune crónico, el sistema inmunológico posee un papel preponderante. La respuesta inmune innata se caracteriza por la secreción de citocinas IL-1 β e IL-15, ambas con efectos proinflamatorios. En la fase inicial de la patología los péptidos de gliadina producen inflamación en el intestino, por la secreción de la citocina proinflamatoria IL-15 y una constante señalización por su receptor IL-15R- α situado en las células del epitelio, esto inicia una respuesta de estrés e inmunidad innata. Entre los principales efectos de esta señalización se tiene la pérdida de la tolerancia oral a los antígenos derivados de la dieta y de la microbiota comensal, debido a la supresión de Treg y de la citocina tolerogénica TGF- β . La IL-15 también promueve funciones efectoras en linfocitos T como la secreción de IFN- γ y mecanismos de citotoxicidad por perforina y granzima, además de la inducción de apoptosis por parte de células NK a través de receptores de muerte celular como NKG2D y CD94, que reconocen a sus receptores, HLA-E y MICA, en enterocitos. La señalización por IL-15 también genera alteraciones estructurales y proliferativas al interactuar con el factor de crecimiento epitelial (EGF), pues esta interacción retrasa la endocitosis e inactivación de su receptor (EGFR), lo que promueve la proliferación celular y remodelación del esqueleto de actina (Barone, *et al.*, 2014).

La IL-1 β es una citocina con un papel preponderante en la respuesta inmune innata en la EC. En experimentos realizados con células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes celíacos HLA-DQ2⁺ cultivadas con gliadina, se observó la secreción de IL-1 β por parte de monocitos, en los cuales la IL-1 β actúa de forma autócrina generando secreción de IL-23 por parte de los mismos; adicionado a esto la gliadina fue capaz de aumentar los niveles de IL-6, TNF- α y CCL20; este perfil de citocinas en conjunto con la IL-1 β y la IL-23 aportan un fuerte estímulo a nivel intestinal, generando inflamación persistente y daño al epitelio intestinal en pacientes con EC (Harris, *et al.*, 2008).

1.2. Sensibilidad al gluten no celiaca

La sensibilidad al gluten no celiaca (SGNC) es una nueva condición clínica recientemente identificada, también descrita como hipersensibilidad al gluten o intolerancia al gluten; en la cual se han descartado mecanismos autoinmunes y alérgicos (Fig. 4). La SGNC es una reacción adversa al gluten y otros antígenos derivados del trigo como: inhibidores de la tripsina y de la α -amilasa, monosacáridos fermentables y polioles. (Tonutti y Bizzaro, 2014).

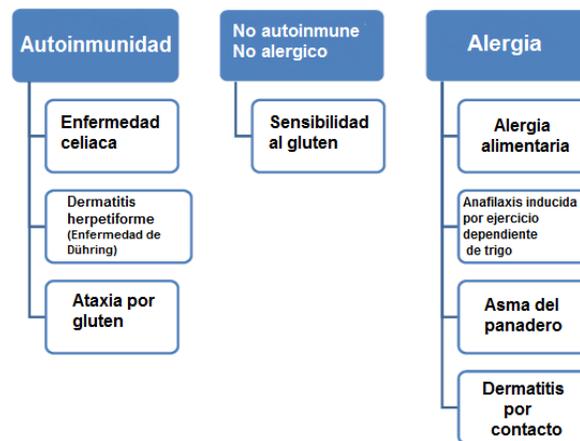


Fig. 4. Desórdenes relacionados al gluten. Término utilizado para describir todos los desórdenes relacionados con la ingesta de alimentos que contienen gluten. La clasificación cubre alergias, enfermedades autoinmunes. En el caso de la SGNC está clasificada como enfermedad probablemente mediada por el sistema inmune (Modificado de Czaja-Bulsa, 2014).

El aumento en la prevalencia de la SGNC se debe a diversos factores como la modificación en los métodos agrícolas y de panificación que producen nuevas variedades de trigo con péptidos de gluten más tóxicos (Koning, 2012). Al tratar de dilucidar la prevalencia de la SGNC se enfrenta un panorama muy diferente al de la EC, debido a que sólo se detecta a nivel de síntomas clínicos, hasta el momento estudios realizados en Italia, Estados Unidos y Nueva Zelanda; manejan prevalencias del 0.63%-6% (Lundin, 2014).

La SGNC y la EC no pueden distinguirse clínicamente, dado que los síntomas que presentan los pacientes con SGNC se observan en pacientes con EC y alergia al trigo. La SGNC se caracteriza por síntomas gastrointestinales o extraintestinales,

los síntomas más frecuentes son: distensión abdominal, dolor abdominal, diarrea, fatiga, salpullido, dolor de cabeza, dolor articular, adormecimiento de las extremidades, depresión y anemia (Czaja-Bulsa, 2014).

Se ha propuesto un conjunto de criterios diagnósticos que se basan principalmente en la exclusión de la EC y la alergia al trigo. El diagnóstico se sustenta en datos clínicos, biológicos, genéticos e histológicos. Existe una asociación directa entre la ingesta de gluten con el inicio de los síntomas y al aplicar la dieta libre de gluten (DLG) desaparecen los síntomas y cuando se reintroduce el gluten a la dieta hay una recaída en la sintomatología. Los pacientes con SGNC no presentan alteraciones histológicas significativas de la mucosa duodenal (criterios de Marsh 0 o 1), la negatividad histológica es un parámetro esencial para su diagnóstico. El estándar de oro para el diagnóstico de la SGNC es el reto doble ciego placebo controlado con gluten, que consiste en un ensayo cruzado con un pan o panqué, que contengan al menos 5g de gluten, al día por dos semanas consecutivas seguidas por una semana de descanso y después dos semanas con un placebo (la misma comida indistinguible a la vista y al gusto pero libre de gluten). Durante todas las fases del estudio se evalúa la severidad de los síntomas usando una escala análoga visual de 100mm, donde 0 representa sin síntomas (Carroccio, *et al.*, 2012).

A la fecha no existen marcadores serológicos o inmunológicos específicos para la SGNC; en estudios serológicos se ha detectado una respuesta positiva a los anticuerpos anti-AGA IgG e IgA en 25% a 56% de los pacientes; mientras que se ha reportado una serología negativa para los anticuerpos anti-DGP (anti-gliadina desaminada) IgG e IgA así como para anti-tTG y anti-EMA (Tovoli, *et al.*, 2015).

Un análisis comparativo de la expresión génica, muestra que los pacientes con SGNC a diferencia de los celíacos, presentan uniones estrechas de la mucosa intestinal sin alteraciones, con una alta expresión de Claudina-4, un componente de las uniones estrechas, por encima de los niveles encontrados en EC (Sapone, *et al.*, 2011).

La disbiosis, cambios en la microbiota intestinal, puede ser otro factor de riesgo al influir directamente en la respuesta inmune de la mucosa intestinal e incidir en el

tipo de antígenos presentes en el lumen intestinal; lo que puede generar una respuesta inflamatoria a los antígenos dietarios como es el caso del gluten (Sjöberg, *et al.*, 2013).

Los pacientes con SGNC presentan hipersensibilidad a múltiples alimentos, lo cual se ha relacionado con una dieta rica en FODMAPs (oligo- di- y mono-sacáridos fermentables y polioles) los cuales causan distensión del lumen intestinal, debido a su pequeño peso molecular y su fermentabilidad; generando síntomas gastrointestinales (Molina-Infante, *et al.*, 2014).

La fisiopatología de la SGNC se ha asociado con la activación de mecanismos de inmunidad innata. En la SGNC se ha encontrado una sobreexpresión del receptor tipo Toll 2 (TLR2), un marcador de activación de la inmunidad innata, así como una inflamación de menor grado al de pacientes celíacos (Nijeboer, *et al.*, 2013).

1.3. Tejido linfoide asociado a intestino y tolerancia oral

La homeostasis intestinal está determinada por la interacción dinámica entre el tejido intestinal, componentes de la microbiota en el lumen y el sistema inmune (Izcue, *et al.*, 2009). La respuesta inmune que se genera contra antígenos inofensivos es la inducción de tolerancia local y sistémica, también conocida como tolerancia oral. Cuando existen fallas en las vías de regulación del sistema inmune se produce inflamación intestinal crónica (Pabst y Mowat, 2012).

Las células epiteliales intestinales están adheridas por uniones estrechas, que forman una barrera selectiva, controlando la entrada de nutrientes pero también el acceso de antígenos derivados de la dieta y de bacterias comensales. Las células epiteliales contribuyen a la homeostasis intestinal y tienen una función importante en la inmunidad al liberar anticuerpos IgA al lumen, producir péptidos antimicrobianos y citocinas proinflamatorias (Peterson y Artis, 2014).

La microbiota desempeña un papel central en la homeostasis intestinal modulando la respuesta inmune, a través de sus estímulos permite el desarrollo completo del tejido linfoide intestinal. Adicionalmente, la microbiota induce la producción de proteínas de choque térmico y citocinas proinflamatorias en el intestino; las cuales influyen en los linfocitos y otros componentes del sistema inmune, generando un

estado basal de inflamación de baja intensidad en el intestino (Kamada, *et al.*, 2013).

El sistema inmune intestinal es la parte más grande y compleja del sistema inmune, se enfrenta a una gran cantidad de antígenos derivados de la dieta y de la microbiota comensal, entre los que debe discriminar a los antígenos inocuos de los organismos invasivos (Berin y Mayer, 2009).

El intestino está asociado a diversos órganos linfoides, colectivamente denominados como tejido linfode asociado a intestino (GALT), el cual puede dividirse en: sitios inductores y efectores. Los sitios inductores son las placas de Peyer (PP), los ganglios linfáticos mesentéricos (MLNs) y los folículos linfoides aislados (ILFs) distribuidos en la pared del intestino delgado y grueso. Estos tejidos tienen una estructura organizada y son responsables de la fase de inducción de la respuesta inmune. Los sitios efectores consisten en linfocitos T de memoria dispersos a través del epitelio y lamina propia de la mucosa intestinal (Mowat, 2003) (Fig. 5).

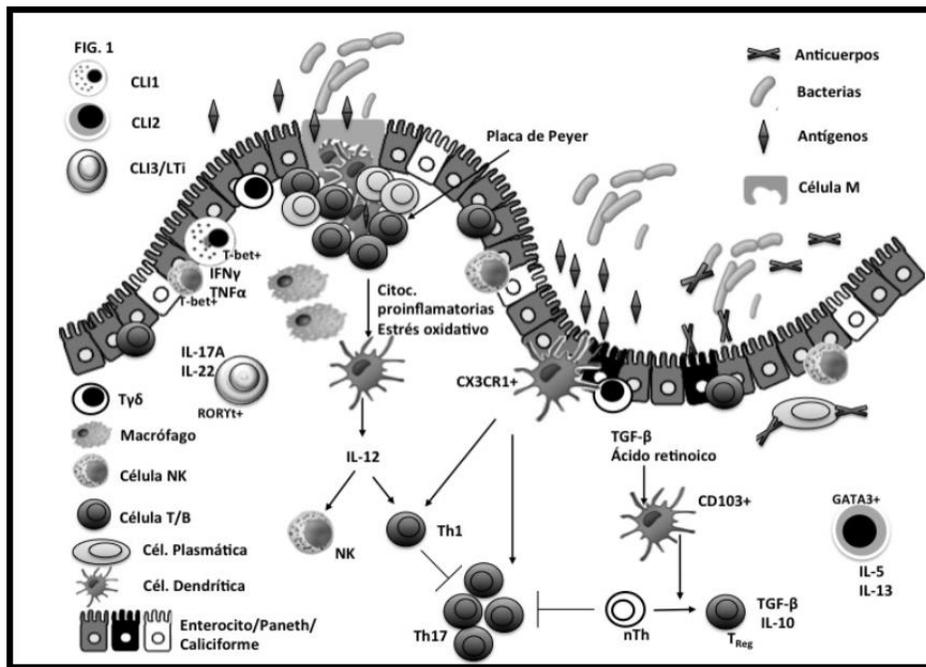


Fig. 5. Sistema inmunitario asociado a la mucosa intestinal está compuesto por: enterocitos encargados de la absorción, células calciformes encargadas de la secreción de moco y células de Paneth que secretan péptidos antimicrobianos. Por linfocitos intraepiteliales, una población heterogénea que actúa como primera

barrera defensiva. Por células M y las células dendríticas (CD) que se encargan de la captación de antígenos. Las CD inducen la diferenciación de diversas subpoblaciones de linfocitos T dependiendo del medio de citocinas a nivel de LP (Montalvillo-Álvarez, 2014).

El GALT posee características distintivas que favorecen la inducción de tolerancia oral: ontogenia y patrón anatómico únicos, células y órganos especializados para la captura de antígenos, poblaciones distintivas de APC, poblaciones inusuales de linfocitos B y T, producción de anticuerpos IgA, moléculas de adhesión y receptores de quimionas para controlar la migración de linfocitos al intestino (Strugnell y Wijburg, 2010).

En la EC y la SGNC el gluten y péptidos relacionados rompen la tolerancia oral mediante la inducción de la inmunidad innata, estimulando APC que generan la infiltración de otras células de la respuesta inmune, generando inflamación de la mucosa intestinal (Catassi, *et al.*, 2013).

1.4. Subpoblaciones de linfocitos T en la EC y la SGNC

La proporción de diferentes subpoblaciones linfocitarias T CD4+ es variable a través del intestino y podría explicarse en base a la misma variación del microbioma a lo largo del tejido intestinal. Las bacterias comensales producen metabolitos que dirigen la diferenciación y especialización de linfocitos T en el intestino (Belkaid y Hand, 2014). Específicamente los fenotipos Treg, Th17 y Th22 se encuentran enriquecidos en el ciego comparado con el íleon terminal y el colon sigmoideo, mientras que subpoblaciones de Th1 y Th2 son consistentes en todas las regiones del intestino. (Pesenacker, *et al.*, 2014).

Los linfocitos T CD4+ CD25+ Foxp3+ reguladores (Treg) están estrechamente relacionados en el mantenimiento de la homeostasis inmune, por lo que muchos estudios han relacionado los cambios en el número y función de linfocitos Treg con la predisposición o perpetuación de la inflamación (Stepniak y Koning, 2006). Debido a la necesidad de mantener tolerancia a bacterias comensales así como antígenos derivados de la dieta, este es un sitio crítico para los linfocitos Treg y

probablemente uno de los tejidos donde existe una gran diferenciación *de novo* de esta subpoblación linfocitaria (Harrison y Powrie, 2013).

Los linfocitos Treg presentes en el intestino tienen dos orígenes, los Treg naturales (nTreg) provenientes de timo y los Treg inducibles (iTreg) que se generan a partir de la presentación de Ag del lumen intestinal por las células dendríticas (CD) y macrófagos (MO) en los MLN. Los Treg son una subpoblación linfocitaria con la función de suprimir y controlar las respuestas inflamatorias patológicas y fisiológicas de manera activa, esto lo logran mediante varios mecanismos, entre ellos la secreción de citocinas anti-inflamatorias: IL-10, IL-35 y TGF- β ; la citotoxicidad mediada por perforina y granzima A y B y la inducción de apoptosis por vías como Fas-FasL y la modulación del microambiente por la generación de adenosina por ectonucleotidasas (Guzmán-Flores y Portales-Pérez, 2013).

Mediante estos mecanismos las Treg forman parte esencial en el mantenimiento de la homeostasis intestinal por lo que cambios en el fenotipo y función de las Treg se asocian a la pérdida de la tolerancia oral al gluten. En estado basal el GALT genera tolerancia a los antígenos dietarios, este medio tolerogénico se mantiene por la influencia de una alta concentración de ácido retinoico y de TGF- β en el intestino, lo que implica que las células presentadoras de antígeno posean un fenotipo tolerogénico (CD103+) y que a su vez estimulen células Treg encargadas de suprimir respuestas proinflamatorias en el intestino (Kupfer y Jabri, 2012).

En pacientes celíacos activos se ha demostrado que la secreción de IL-15 e IL-21, son factores de regulación negativa para los linfocitos Treg (Meresse, *et al.*, 2008). En experimentos con linfocitos aislados de lámina propia y sangre periférica de pacientes celíacos activos, se demostró una resistencia a la supresión por linfocitos Treg, mediada por IL-15. Esta deficiencia en la función de los linfocitos Treg generados en pacientes celíacos, puede estar relacionada con la pérdida de la tolerancia oral al gluten y la asociación de otras patologías autoinmunes a la condición de celiaquía (Hmida, *et al.*, 2012).

Una vez que se ha perdido la tolerancia oral, por influencia de citocinas proinflamatorias se induce la activación de linfocitos T cooperadores (Th) CD4+ gluten específicos en lámina propia, necesarios para el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. Los linfocitos Th CD4+ son una población celular involucrada en funciones de mantenimiento, auto-tolerancia y modulación de la respuesta inmune, que están subdivididos en diferentes subtipos dependiendo de los factores de transcripción expresados y citocinas secretadas. (Schuppan, *et al.*, 2009).

Los linfocitos Th1 poseen mecanismos efectores contra agentes exógenos y se caracterizan por el factor de transcripción T-bet y la secreción de IFN- γ . En la literatura se encuentra reportado que la respuesta inflamatoria generada por la EC es de tipo Th1, por la detección niveles elevados de IFN- γ . La liberación de IFN- γ induce una mayor expresión de moléculas del HLA-DQ en células presentadoras de antígeno, permitiendo una presentación más eficiente de los péptidos del gluten, amplificando la respuesta inflamatoria (Koning, 2012.) Sin embargo, un grupo celular implicado recientemente en la patogénesis de la EC es la respuesta celular Th17 que se caracteriza por la secreción de IL-17 (McAllister y Kagnoff, 2012).

La principal fuente de IL-17 en la inmunidad adaptativa es la subpoblación linfocitaria Th17. La polarización de linfocitos T CD4+ al linaje Th17 está controlado por la expresión del factor de transcripción receptor huérfano relacionado al ácido retinoico gama t (ROR- γ t), adicionalmente ROR- α es otro factor de transcripción Th17 linaje específico que sinergiza con ROR- γ t para la producción de IL-17A e IL-17F. La polarización inicial a este linaje se da por la unión de la IL-6 a su receptor IL-6R que activa la señalización por STAT3 y la expresión de IL-21, después la sinergia de IL-21 con IL-6 sostiene la señalización por STAT3 que permite la expresión de ROR- γ t y ROR- α , que a su vez reprimen la expresión de Foxp3. Otra vía para la activación de ROR- γ t es a través de TGF- β que vía SMADs induce la expresión de IL-1R e IL-23R, volviéndolas receptivas a IL-1 β e IL-23. ROR- γ t, ROR- α y STAT3 se unen a los promotores de las citocinas de Th17 como IL-17A, IL-17F e IL-21; para dirigir su transcripción. En la

fase tardía de la diferenciación de linfocitos Th17, la señalización por IL-23/IL-23R inducida por TFG- β e IL-6/IL-21 aumenta la señalización por STAT3 y la expresión de ROR- γ t estabilizando el linaje Th17 (Kumar y Subramaniyan, 2014) (Fig. 6).

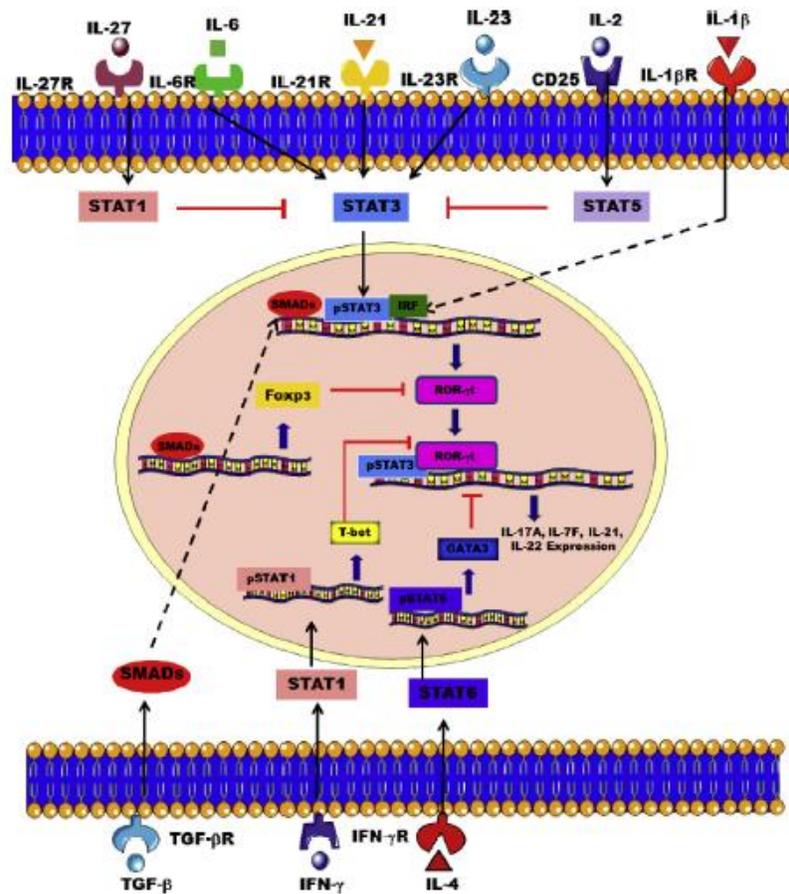


Fig. 6. Regulación de la polarización al linaje Th17. La estimulación por las citocinas IL-6, IL-21 e IL-23 y bajas concentraciones de TGF- β , permiten la polarización y activación de los linfocitos Th17. A su vez existe una fuerte regulación negativa por las citocinas IL-2, IL4, IL-27 e IFN- γ que activan los factores de transcripción T-bet, GATA3 y Fcpx3 que reprimen a ROR- γ t (Kumar y Subramaniyam, 2015).

La regulación negativa de este fenotipo linfocitario esta mediada por la expresión de receptores con función supresora como IL-27R e CD25 así como por efectos inducidos por citocinas IFN- γ , IL-2, IL-27 que activan factores de transcripción

como Foxp3, T-bet y GATA3 que antagonizan a ROR- γ t (Kumar y Subramaniyan, 2014).

Los linfocitos Th17 se caracterizan por la producción y liberación de IL-17A, IL-17F, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , factor estimulador de colonia de granulocito y macrófago (GM-CSF), CCL20, CCL22; capaces de estimular células endoteliales, epiteliales, fibroblastos, y macrófagos (Gaffen, *et al.*, 2014).

La IL-17 es una citocina proinflamatoria, formada por un polipéptido de 155 residuos de aminoácidos. La familia de IL-17 está conformada por 6 miembros: IL-17 A, B, C, D, E y F; con una identidad del 16-50% en su secuencia pero con diferentes patrones de expresión tisular. Existe una asociación entre la sobreproducción estas citocinas con enfermedades autoinmunes y se ha observado una disminución en la intensidad de estas patologías al bloquear su producción o su modo de acción (Shabgah, *et al.*, 2014).

De manera fisiológica la respuesta Th17 protege al organismo de infecciones bacterianas y fúngicas mediante el reclutamiento y señalización de diversas células de la respuesta inmune, incluyendo neutrófilos, tipo celular característico de esta respuesta. Esta respuesta inmunitaria genera una potente cascada pro inflamatoria lo que implica que fallas en las vías de regulación generan desórdenes inflamatorios y que se relacionan con enfermedades autoinmunes. (Singh, *et al.*, 2014).

En experimentos con células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con EC se detectó la expresión de T-bet, pSTAT-1 e IFN- γ , factores de transcripción y citocinas del fenotipo Th1; así como pSTAT-3, IL-17, factor de transcripción y citocina del fenotipo Th17; así como IL-10. Encontrando que sólo se elevan los marcadores de linfocitos Th1 en el estado activo de la enfermedad celiaca (Frisullo, *et al.*, 2009).

Por todo lo anterior en este trabajo nos propusimos evaluar las respuestas linfocitarias Th1, Th17 y la presencia de linfocitos Treg, que se generan en el proceso inflamatorio de individuos celíacos y sensibles al gluten no celíacos, ya que hasta el momento se mantiene en discusión qué tipo de respuesta caracteriza a cada una de estas patologías.

2. Antecedentes

La falla en la inducción de tolerancia hacia el gluten ha sido abordada por diversos grupos como Garrote *et al.*, los cuales proponen que la activación de linfocitos T efectores es un punto crucial en la patogenia de la EC, por lo que analizaron las citocinas generadas y las vías de señalización STAT (Transductor de señales y activador de la transcripción) activadas debido a la interacción del gluten con la mucosa intestinal. Detectando grandes cantidades de IFN- γ en la mucosa intestinal y la producción de IL-15, IL-18 e IL-21. Proponen que la respuesta inflamatoria puede estar dirigida y sostenida por la acción de IL-18, IL-21 (sólo en lamina propia con activación de STAT1 para producir IFN- γ) e incluso IL-27, a través de las vías de STAT1 y STAT5, sin encontrar un papel significativo para IL-12 e IL-23 (Garrote, *et al.*, 2008).

La implicación de la respuesta Th17 en la EC se inició con la detección de citocinas características de esta respuesta en tejido o sangre de pacientes con esta enfermedad. La emergencia del eje IL-23-Th17 dio lugar a un nuevo análisis del daño tisular mediado por células que previamente se había atribuido al eje IL-12-Th1 y subrayó un papel fundamental de la inmunidad innata en moldear la respuesta inmune adaptativa.

Existen personas con haplotipos HLA-DQ2⁺ o DQ8⁺ que al contacto con el gluten no desarrollan EC, el grupo de Harris *et al.*, detectaron una mayor producción de IL-1 β e IL-23 en pacientes celíacos respecto de controles sanos. Este grupo se planteó si la señalización por estas citocinas era clave para el desarrollo de la EC y si además esta respuesta diferencial podría explicar también las manifestaciones clínicas. Debido a que la IL-23 así como la IL-1 β son citocinas relacionadas con la respuesta celular Th17, también se planteó que el daño tisular en esta patología podría estar mediada por el fenotipo linfocitario Th17. Este grupo demostró que la IL-1 β por sí misma induce la producción de la IL-23 inducida por gliadina en CMSP de pacientes con EC y que el bloqueo del receptor de IL-1(IL-1R) por un antagonista suprime dicha señalización e induce la reducción en la secreción de IL-1 β , TNF- α e IL-6 (Harris, *et al.*, 2008).

El grupo de Monteleone *et al.*, detectaron la producción de altos niveles de IL-21 en la EC activa, una citocina relacionada con la regulación de la respuesta Th17, por lo que decidieron investigar el papel de la respuesta Th17 en esta patología. Este grupo caracterizó las células productoras de IL-17A en la mucosa intestinal y analizaron el control de su secreción por la IL-21. Ellos encontraron que gran cantidad de la IL-17A es secretada por linfocitos CD4+ y CD4+CD8+ que también secretan IFN- γ , pero que carecen del marcador CD161 y que la producción de IL-17A está regulada por la IL-21 (Monteleone, *et al.*, 2010).

El grupo de Sapone *et al.*, realizaron la detección de los niveles de IL-17A en muestras de intestino delgado en pacientes con EC y SGNC encontrando sólo una expresión significativamente alta en los pacientes celíacos (Sapone, *et al.*, 2010).

Brottveit *et al.*, analizaron la producción de citocinas en la mucosa intestinal de pacientes con EC y SGNC tras un reto con gluten de 3 días. Encontrando que una expresión significativamente alta de IL-8, TNF- α e IFN- γ para los pacientes celíacos y sólo una expresión significativamente alta de IFN- γ para los sensibles al gluten, con una marcada infiltración de LIE (Brottveit, *et al.*, 2013).

Sapone *et al.*, estudiaron la expresión de genes asociados a la función de barrera intestinal así como del sistema inmune en celíacos y sensibles al gluten con el fin de encontrar similitudes y diferencias entre ambas patologías. En la SGNC encontraron una disminución en la permeabilidad intestinal debido a un aumento el expresión de claudina 4 (CLDN4), una proteína integral de membrana. También se encontró un aumento en la expresión del receptor tipo Toll 2 (TLR2) en los pacientes sensibles al gluten y no en los celíacos. También una reducción en la expresión del factor de transcripción Foxp3 en la SGNC respecto del control y del grupo de EC. El estudio concluye puntualizando que la EC y la SGNC son dos entidades clínicas distintas, en dónde la inmunidad innata está asociada a la SGNC (Sapone, *et al.*, 2011).

3. Justificación

La EC es una patología desencadenada por el consumo de gluten en pacientes con predisposición genética. Adicionalmente se ha identificado un grupo de pacientes sensibles al gluten con sintomatología similar sin compartir marcadores serológicos ni genéticos con la EC.

La respuesta inmune de la EC no está completamente caracterizada mientras que la de SGNC se desconoce. En esta investigación se busca caracterizar la participación de linfocitos Th1, Th17 y Treg en ambas patologías.

4. Hipótesis

La respuesta inflamatoria de pacientes con enfermedad celiaca será de tipo Th17 mientras que en los individuos sensibles al gluten no celiacos estará polarizada hacia una respuesta celular de tipo Th1.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Evaluar el fenotipo linfocitario de la respuesta inmune celular y sus citocinas características en pacientes celíacos y sensibles al gluten no celíacos.

5.2. Objetivos particulares

1. Identificar las poblaciones celulares Th17, Th1 y Treg en los linfocitos aislados de individuos celíacos y sensibles al gluten no celíacos utilizando marcadores de superficie, factores de transcripción y producción de citocinas.
2. Detectar citocinas implicadas en la diferenciación y mantenimiento de los linajes Th1, Th17 y Treg en cortes de tejido duodenal de individuos celíacos y sensibles al gluten no celíacos.

6. Metodología

El estudio realizado fue prospectivo, simple y ciego; todos los participantes firmaron la carta de conocimiento informado y el protocolo de investigación se aprobó por el comité de ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).

6.1. Población

La fase de selección de los pacientes y sujetos control, así como la realización de las pruebas clínicas y de gabinete, se realizaron en el INCMNSZ.

El estudio incluyó a 35 pacientes: 16 pacientes con EC, 9 pacientes con SGNC y 10 pacientes control.

El grupo de estudio (EC y SGNC) incluyó 25 pacientes que ingresaron al INCMNSZ por diarrea crónica con diagnóstico de síndrome de absorción intestinal deficiente (SAID).

El grupo control se conformó por 10 sujetos que no presentaron diarrea, a los cuales se les practicó endoscopia del tubo digestivo superior por otra causa que no fuera SAID.

Criterios de inclusión para el grupo de EC

- 1) Diagnóstico reciente de EC.
- 2) Mayores de 18 años.
- 3) Sin dieta libre de gluten.
- 4) Que requirieran una endoscopia superior con fines diagnósticos.
- 5) Dar resultado positivo para dos de los tres siguientes anticuerpos: Anti-gliadina deaminada (GD-IgG), Anti-transglutaminasa tisular IgA (tTg-IgA) y Anti-endomisio (EMA-IgA).
- 6) Presentar alteraciones histológicas en el duodeno compatibles con la clasificación de Marsh III o IV.
- 7) Genotipo HLA-DQ2 o HLA-DQ8.

Criterios de inclusión para el grupo de SGNC

- 1) Diagnóstico reciente de SGNC.
- 2) Mayores de 18 años.
- 3) Sin dieta libre de gluten.
- 4) Que requirieran una endoscopia superior con fines diagnósticos.
- 5) Síntomas similares a los pacientes con EC.
- 6) Dar resultado positivo para el anticuerpo: Anti-gliadina nativa (AGA-IgG).
- 7) Dar resultado negativo para anticuerpos Anti-transglutaminasa tisular IgA (tTg-IgA) y Anti-endomisio (EMA-IgA).
- 8) Negativo a pruebas de alergia al trigo (IgE en sangre).
- 9) Histología duodenal normal, compatible con la clasificación de Marsh 0 y 1 (sin alteraciones histológicas).

Criterios de exclusión

Presentar cualquiera de las siguientes condiciones:

- 1) Neoplasias malignas.
- 2) Inmunocompromiso
- 3) Bulboduodenitis erosiva.
- 4) Infección en las dos semanas previas a la toma de la muestra.
- 5) Embarazo
- 6) Ingesta reciente de antimicrobianos, probióticos, inmunosupresores, anti inflamatorios no esteroides y/o corticoesteroides.
- 7) Trastornos de coagulación que limiten la toma de tejido para biopsias de intestino.
- 8) Enteropatías secundarias: sobrepoblación bacteriana, esprue tropical, medicamentosa o infecciosa.
- 9) Insuficiencia renal.

6.2. Obtención de linfocitos a partir de biopsias duodenales

Mediante endoscopía superior practicada en los pacientes y sujetos control se tomaron tres biopsias del bulbo duodenal y cuatro biopsias de la segunda porción del duodeno, se colocaron en un tubo de microcentrífuga de 2ml (Eppendorf) con

1ml de Solución salina buffer de Hank (HBSS) libre de Ca^{++} y Mg^{++} , 5% suero fetal bovino (SFB, GIBCO). Los tubos con las biopsias se transportaron con geles refrigerantes al laboratorio para su análisis.

El tejido de las biopsias se trasladó a una solución con buffer de fosfatos (PBS) (NaCl 8g, KCl 0.2g, Na_2HPO_4 1.44g, KH_2PO_4 0.24g) ácido etildiaminotetraacético (EDTA) 2mM en un tubo de microcentrífuga (Eppendorf) de 1ml. Se centrifugaron los tubos con HBSS a 800g 5 min 25°C para recuperar células presentes en la solución. El botón obtenido se resuspendió y se agregó al tubo con PBS EDTA 2mM, el cual se incubó a 37°C por 30min con agitación.

Al finalizar la incubación las biopsias se pasaron a una caja Petri de plástico estéril con 500ul de PBS estéril para lavar la primera solución de incubación, y se disgregaron mecánicamente con una hoja de bisturí y pinzas estériles.

Las biopsias disgregadas se pasaron a un tubo de 500µl con PBS Colagenasa IV (Sigma) a una concentración de 60U/ml. De manera adicional se centrifugó el tubo de la primera incubación a 800g 5 min 25°C, para recuperar las células que se liberaron en el sobrenadante y se agregaron al tubo con la Colagenasa IV. El tubo con las biopsias se incubó por 1h a 34°C con agitación.

Posterior a la incubación la suspensión celular se pasó por un separador celular de 40µm (Cell Strainer BD Falcon) en tubo cónico para centrífuga (Falcon) de 50ml. El tubo con la Colagenasa IV se lavó con 2ml de PBS, y este volumen también se pasó por el separador celular, para recuperar el mayor número de células posibles. El tubo cónico con la suspensión celular se centrifugó a 800g por 10min a 25°C.

Se decantó el sobrenadante del tubo cónico y el botón celular se resuspendió en 1ml de PBS, se agregó 1µl de Brefeldina A (BD GolgiPlug) y se dejó incubando por 1h a 37°C con 5% de CO_2 .

Tras la incubación se evaluó el número y viabilidad celular en una cámara de Neubauer con una mezcla de 10µl de la suspensión celular y 90µl de azul de Tripán 0.4% (Gibco), se realizó el conteo de 4 cuadrantes y se determinó la viabilidad por exclusión con Azul de Tripán (viabilidad >90%).

6.3. Aislamiento de CMSP de pacientes

Se recolectó la muestra sangre periférica de los pacientes y sujetos control por venopunción utilizando el sistema de recolección de sangre BD Vacutainer tubos con EDTA (BD) para evitar la coagulación de la muestra. Se diluyó el volumen de sangre con un volumen igual de PBS estéril y se mezcló por inversión en un tubo cónico de 15ml (Falcon). A continuación se le añadió al tubo cónico un volumen de Ficoll equivalente al volumen de la sangre diluida con PBS. El PBS y el Ficoll se utilizaron a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 425g con aceleración y freno 0 a 18°C durante 30 min.

Con una pipeta de transferencia (Thermo SCIENTIFIC) estéril se obtuvo el anillo de células mononucleares evitando romper el gradiente de densidad formado. El cual se transfirió a un tubo cónico de 15ml (Falcon) para realizar un lavado con PBS estéril usando 3 veces el volumen de las células aisladas, en el cual se resuspendieron las células suavemente y se centrifugaron a 425g con aceleración 6 y freno 6 durante 10 minutos a 18°C.

El tubo se decantó y las células se resuspendieron en 1ml de PBS y se agregó 1µl de Brefeldina A (BD GolgiPlug), las células se incubaron a 37°C, CO₂ 5% durante 1h.

Posterior a la incubación se realizó el conteo celular, de la suspensión celular se tomaron 10µl y se mezclaron con 90µl de azul de Tripan 0.4% (Gibco), de la mezcla se colocaron 10µl en la cámara de Neubauer (MADESA), se hizo el conteo de 4 cuadrantes y se determinó la viabilidad por exclusión con Azul de Tripan (>90%).

6.4. Análisis de las poblaciones linfocitarias por citometría de flujo

Por citometría de flujo se analizaron dos muestras por cada paciente, una de linfocitos aislados de biopsia duodenal y otra de linfocitos aislados de sangre periférica (Tabla 1).

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en los experimentos de citometría de flujo.

Célula blanco	Marcador	Detector	Reportero	Fabricante	Clona	No. catálogo
Linfocitos Th	CD4	BL1	FITC	BioLegend	OKT4	317408
Treg	Foxp3	BL2	PE	BioLegend	206D	320108
Th1	T-bet	BL3	PerCP-Cy5.5	BD Pharmigen	O4-46	561316
Th1	IFN- γ	RL2	APC-Cy7	BioLegend	4S.B3	502530
Th17	ROR- γ t	RL1	APC	R&D Systems	600380	IC6006A
Th17	IL-17A	BL4	PE-Cy7	BioLegend	BL168	512315

Para compensar se utilizó el kit AbC Anti-Mouse Bead (Invitrogen) que consta de perlas de poliestirero negativas y de captura. El control negativo fueron perlas negativas, sin capacidad de unión de anticuerpos y para los controles de compensación de cada uno de los canales (BL1, BL2, BL3, BL4, RL1 y RL2) se ocuparon una mezcla de perlas negativas con perlas de captura acopladas al anticuerpo específico para cada canal.

Para la fenotipificación de linfocitos intraepiteliales (LIE) y linfocitos de sangre periférica (LSP) se utilizaron anticuerpos específicos para cada subpoblación. Todos los LIE y LSP fueron identificados como CD4+, marcador de linfocitos T cooperadores (Th). Dentro de los linfocitos T CD4+ se buscaron las subpoblaciones de linfocitos Treg con la expresión del factor de transcripción Foxp3+; la subpoblación de linfocitos Th1 con la expresión del factor de transcripción T-bet+ y la producción de IFN- γ + y la subpoblación de linfocitos Th17 con la expresión del factor de transcripción ROR- γ t+ y la producción de IL-17A+.

6.4.1. Tinción extracelular de los linfocitos

Se centrifugó la suspensión celular 5 min a 720g, con freno 6 y aceleración 6, 18°C, se retiró el sobrenadante con micropipeta para concentrar las células en un volumen de 50 μ l de buffer de tinción (PBS +SFB 1%)

Se incubaron las células con una concentración 1:50 del anticuerpo anti-CD4 para la identificación de linfocitos T cooperadores (Th). Se agitó el tubo manualmente

después de la adición del anticuerpo, para evitar agregados celulares, y se incubaron las células durante 30 min a temperatura ambiente protegido de la luz.

Tras la incubación se lavaron las células con 400µl de buffer de tinción (PBS SFB 1%) y se centrifugaron a 800g, 10 min, con freno 6 y aceleración 6, 18°C.

6.4.2. Tinción intracelular de los linfocitos

Se resuspendió el botón celular obtenido durante la tinción extracelular en 150µl de Fix/Perm (BD GolgiPlug) y se incubaron las muestras durante 50 min protegidas de la luz a temperatura ambiente.

Al finalizar la incubación se agregaron 300µl de Perm/Wash Buffer (BD GolgiPlug) directamente a las células fijadas y permeabilizadas y se resuspendieron suavemente hasta desagregar las células. Se centrifugaron a 800g a 18°C por 10 min y se retiró el sobrenadante con micropipeta dejando un volumen final de 50µl de la suspensión celular.

En 50µl de Perm/Wash Buffer se agregaron los anticuerpos para los factores de transcripción y citocinas intracelulares: Foxp3, T-bet, IFN- γ , ROR- γ t, IL-17A. Se incubaron las células a temperatura ambiente por 50 min protegidos de la luz. Se resuspendieron las células suavemente antes de lavarlas con 300µl de Perm/Wash Buffer (BD GolgiPlug). Las células se centrifugaron a 800g a 18°C por 5 min. Se aspiró el sobrenadante y se realizó otro lavado con 300µl de Perm/Wash Buffer (BD GolgiPlug) a 800g a 18°C por 5 min. Se resuspendió el pellet celular en 350µl de buffer de tinción y se analizaron las células por citometría de flujo.

6.5. Análisis de los linfocitos marcados por citometría de flujo

Para el análisis de las muestras se utilizó el citómetro de flujo Attune Acoustic Focusing Cytometer Blue/Red (Life Technologies), con su correspondiente programa de análisis Attune® Cytometric Software v2.1.

Se adquirió el control de autofluorescencia, CMSP sin teñir, se ajustaron los voltajes de los parámetros de forward scatter (FSC) y side scatter SSC y con la ventana R1 se delimitó la población de linfocitos.

Tras este paso se ajustó la señal de autofluorescencia en los seis canales del citómetro de flujo.

A continuación se adquirieron los controles de compensación para cada uno de los seis canales que se utilizaron para el análisis de las muestras, en este caso se indica al citómetro mediante la ventana R2 cuál es la señal de fluorescencia de las células teñidas con el fluorocromo utilizado.

Tras la compensación se adquirieron 10,000 eventos de LSP y LIE y se obtuvo el valor de la intensidad media de fluorescencia (MFI) para cada uno de los marcadores extracelulares e intracelulares.

6.6. Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica se realizó en cortes de tejido duodenal de 4µm, embebidos en parafina, de los cuales se realizaron tinciones simples y dobles con anticuerpos dirigidos contra citocinas proinflamatorias, antiinflamatorias y fibrogénicas (Tabla 2).

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en la técnica de inmunohistoquímica.

Anticuerpo	Origen	Dilución	Marca
IL-1β	Ratón	10 µg/ml	Abcam
IL-2	Conejo	1/250	Abcam
IL-4	Ratón	10 µg/ml	BioLegend
IL-6	Ratón	1 µg/ml	Abcam
IL-8	Ratón	10 µg/ml	Abcam
IL-10	Ratón	5 µg/ml	Abcam
IL-12p40	Conejo	10 µg/ml	Abcam
IL-15	Ratón	3 µg/ml	Abcam
IL-17A	Conejo	10 µg/ml	Abcam
IL-21	Conejo	10 µg/ml	Abcam
IL-22	Ratón	10 µg/ml	Abcam
IFN-γ	Ratón	10 µg/ml	Abcam
TGF-β1	Conejo	10 µg/ml	Abcam
TNF-α	Ratón	10 µg/ml	Abcam

6.6.1. Protocolo para inmunohistoquímica

Se desparafinaron las laminillas con biopsias de tejido duodenal (grosor 4µm) durante 45 min a 54°C en el horno (Riossa). Posteriormente se hidrató el tejido sumergiendo las laminillas por 3 min con agitación en: Xileno, Etanol/xileno 1/1, Etanol 100%, Etanol 50%, agua destilada (en este orden). Se eliminó el exceso de agua y se hidrató el tejido con PBS. Se incubó el tejido con una solución de H₂O₂ (DAKO) durante 5 min, se eliminó el exceso de reactivo con de PBS y se dejó reposar las laminillas en un baño de PBS. Posteriormente se eliminó el exceso de PBS y se adicionó el anticuerpo primario o el control negativo se incubó durante 30 min. El exceso de anticuerpo se eliminó con PBS y se dejó reposar las laminillas en un baño de PBS durante 5 min. Se realizaron 2 lavados con PBS de 5 min cada uno. Se aplicó el reactivo LINK (DAKO) hasta cubrir el tejido se incubó durante 15 a 30 min. El exceso de anticuerpo se eliminó con PBS y se dejó reposar las laminillas en un baño de PBS durante 5 min. Se realizaron 2 lavados con PBS de 5 min cada uno. Se aplicó el reactivo Streptavidin (DAKO) hasta cubrir el tejido se incubó durante 15 min. El exceso de anticuerpo se eliminó con PBS y se dejó reposar las laminillas en un baño de PBS durante 5 min. Se realizaron 2 lavados con PBS de 5 min cada uno. Se aplicó el reactivo de revelado [1ml de la solución de sustrato-cromógeno (DAKO) + 20 µl (1 gota) del cromógeno DAB (DAKO)] hasta cubrir el tejido se incubó durante 15 min. Se lavó con agua destilada y se realizó la contratinción con hematoxilina de Harris (MERCK) durante 2 a 5 min. Se lavó con agua destilada y se sumergió 10 veces en solución de hidróxido de amonio 0.037 mol/L (2.5 ml de NH₄OH concentrado + 1 l de agua destilada). Posteriormente se lavó con agua destilada durante 2 min y las laminillas se secaron en el horno y se montaron con resina (DAKO) y cubreobjetos.

6.7. Análisis estadístico de los resultados

6.7.1. Datos obtenidos por de citometría de flujo

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos a través de citometría de flujo, se calcularon los porcentajes de la expresión de los marcadores, en cada una de

las muestras de biopsias duodenales y sangre periférica. Se utilizó el software GraphPad Prism para Windows (versión 6.01 GraphPad software Inc. EEUU) para las diferentes pruebas estadísticas. Para el análisis de los resultados de citometría se usó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, con significancia estadística de $p < 0.05$.

6.7.2. Datos obtenidos por inmunohistoquímica

Por cada citocina detectada (una laminilla por paciente) se realizó un conteo por 3 observadores independientes. Se contabilizaron las células positivas en 2 campos para lamina propia y 2 campos para epitelio, cada campo compuesto al menos por 100 células. De cada campo se contabilizaron las células que sean positivas al marcador.

Como prueba de comparación múltiple se utilizó el test de Holm-Sidak, con significancia estadística de $p < 0.05$.

7. Resultados

7.1. Subpoblaciones linfocitarias en sangre e intestino.

Por citometría de flujo se analizaron en total las muestras de: 7 pacientes con EC, 7 pacientes con SGNC y 9 pacientes control. Los datos de la población de estudio son los siguientes: rango de edad 21-73 años, edad media 47 años, 78.8% mujeres y 21.2% de hombres.

Los resultados de la citometría de flujo se expresan como porcentajes y fueron analizados mediante el test no-paramétrico Kruskal-Wallis. Como descriptivos estadísticos para cada una de las subpoblaciones de LIE y LSP se utilizaron la media de todos los porcentajes de las muestras analizadas.

7.1.1. Análisis de las muestras por citometría de flujo

El marcador CD4+ de linfocitos T cooperadores en sangre mostró una tendencia de aumento en los grupos de pacientes con SG y EC. La detección realizada en muestras duodenales tuvo un incremento de linfocitos Th en el grupo de pacientes con EC siendo mayor respecto del grupo control, con una significancia estadística de $p=0.0025$ (Fig.7).

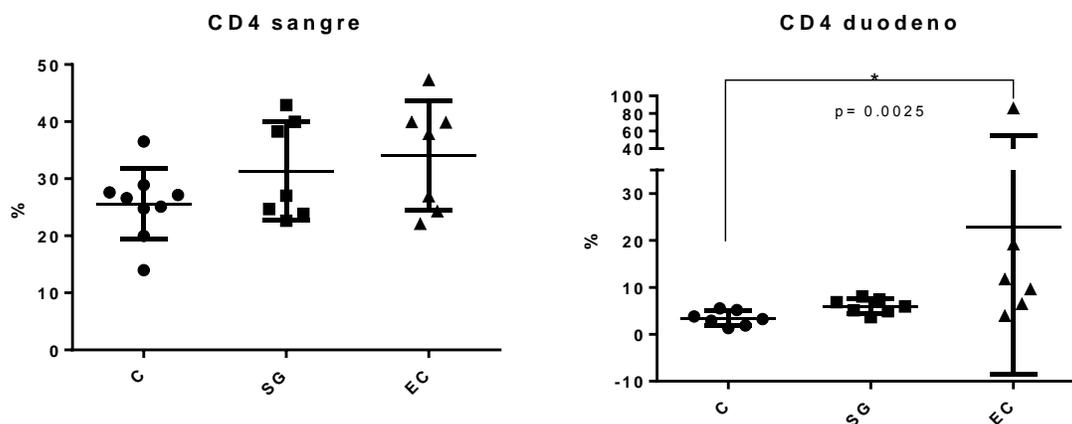


Fig. 7. Porcentaje de células positivas para el marcador CD4 de linfocitos Th en muestras de sangre y duodeno. Expresión significativamente mayor en el grupo de pacientes con EC respecto del grupo control en duodeno ($p=0.0025$). La media se ilustra con una barra. Análisis en sangre: Control ($n=9$), SG ($n=7$) y EC ($n=7$). Análisis en duodeno: Control ($n=7$), SG ($n=7$) y EC ($n=6$).

La expresión del factor de transcripción Foxp3 en sangre no mostró diferencias significativas entre los grupos pero se observa una tendencia de mayor expresión en el grupo de pacientes con SG. En duodeno el grupo de pacientes con EC mostró un incremento respecto del grupo control con significancia estadística de $p=0.039$ (Fig. 8).

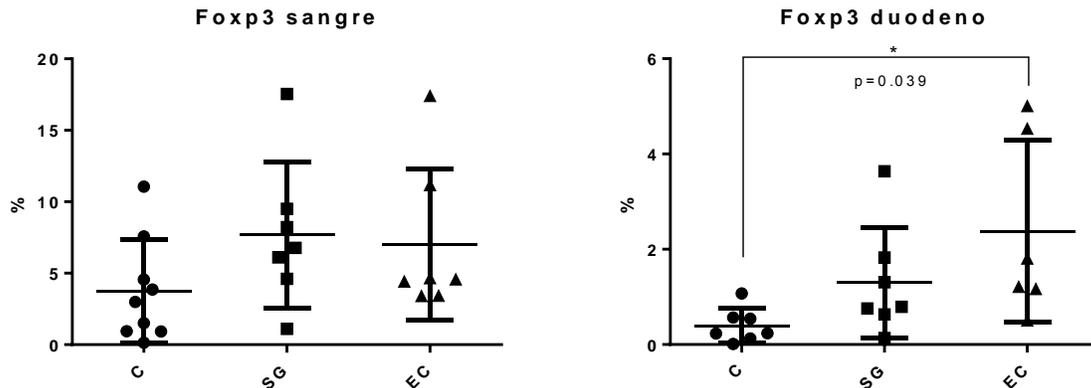


Fig.8. Porcentaje de células positivas para el factor de transcripción Foxp3 en muestras de sangre y duodeno. Expresión significativamente mayor en el grupo de pacientes con EC respecto del grupo control en duodeno ($p=0.039$). La media se ilustra con una barra. Análisis en sangre: Control (n=9), SG (n=7) y EC (n=7). Análisis en duodeno: Control (n=7), SG (n=7) y EC (n=6).

La expresión del factor de transcripción de T-bet en sangre no tuvo diferencias significativas entre los grupos, sólo se muestra una tendencia de mayor expresión en el grupo de pacientes con SG. En tejido duodenal el grupo de pacientes con EC tuvo una expresión significativamente mayor respecto del grupo control con una $p=0.0358$ (Fig. 9).

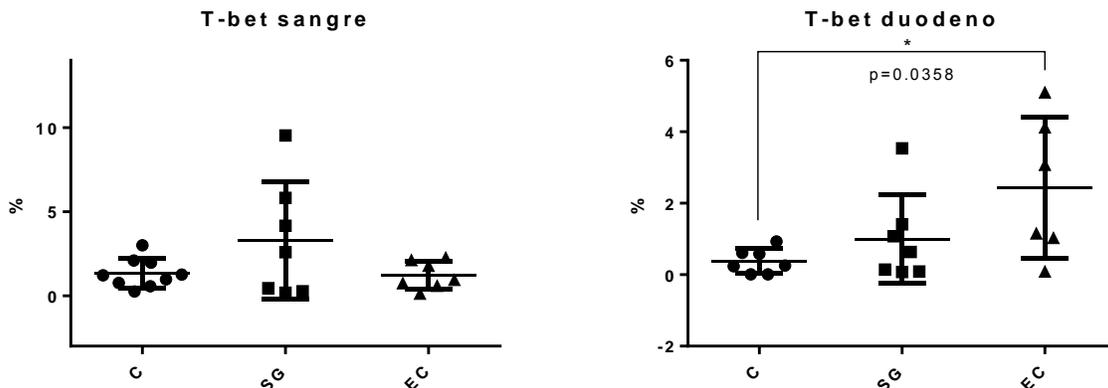


Fig. 9. Porcentaje de células positivas para el factor de transcripción T-bet en muestras de sangre y duodeno. Expresión significativamente mayor en el grupo de pacientes con EC respecto del grupo control en duodeno ($p=0.0358$). La media se ilustra con una barra. Análisis en sangre: Control (n=9), SG (n=7) y EC (n=7). Análisis en duodeno: Control (n=7), SG (n=7) y EC (n=6).

La expresión del factor de transcripción ROR- γ en sangre no tuvo diferencias significativas entre los grupos de estudio. La determinación en duodeno muestra una tendencia clara de mayor expresión el grupo de pacientes con EC y SG, sin tener significancia estadística (Fig. 10).

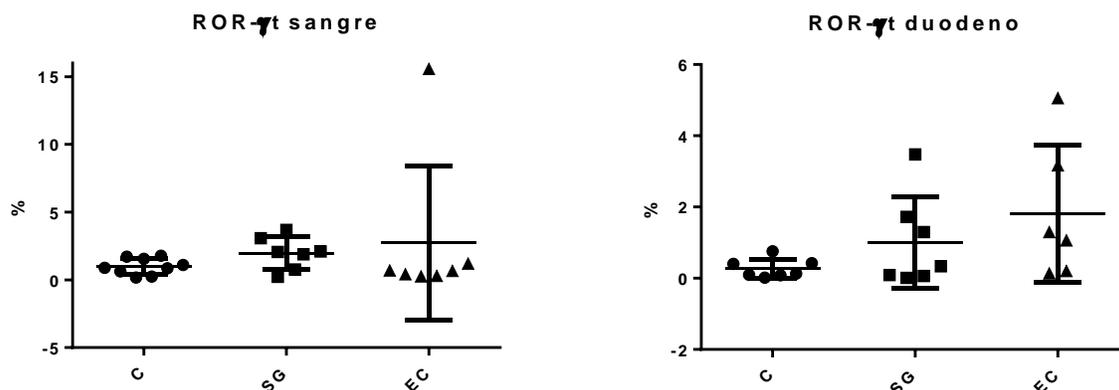


Fig. 10. Porcentaje de células positivas para el factor de transcripción ROR- γ t en muestras de sangre y duodeno. La media se ilustra con una barra. Análisis en sangre: Control (n=9), SG (n=7) y EC (n=7). Análisis en duodeno: Control (n=7), SG (n=7) y EC (n=6).

La producción de IFN- γ en linfocitos de sangre y duodeno no mostraron diferencias significativas entre los grupos de estudio (Fig. 11).

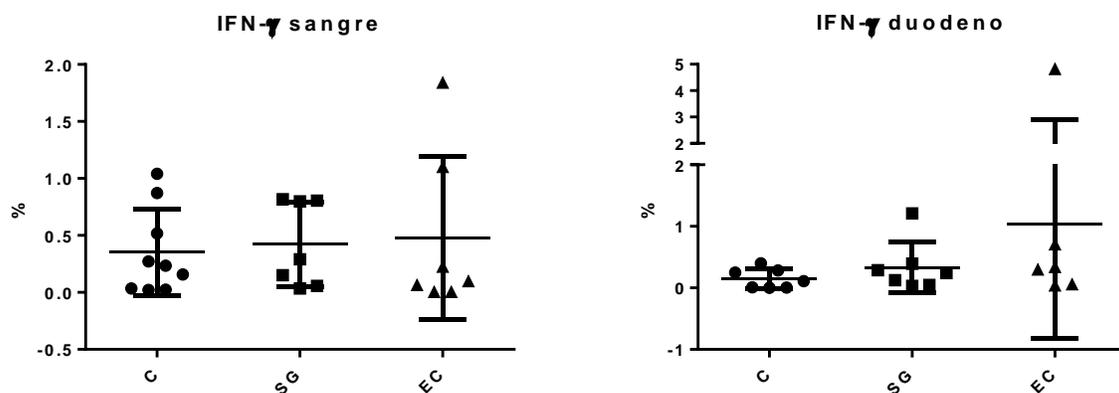


Fig. 11. Porcentaje de células positivas para la citocina IFN- γ en muestras de sangre y duodeno. La media se ilustra con una barra. Análisis en sangre: Control (n=9), SG (n=7) y EC (n=7). Análisis en duodeno: Control (n=7), SG (n=7) y EC (n=6).

La producción de IL-17A en sangre y duodeno no mostraron diferencias significativas entre los grupos de estudio. En duodeno se puede observar una tendencia de aumento en los grupos de pacientes con EC y SG respecto del grupo control (Fig. 12).

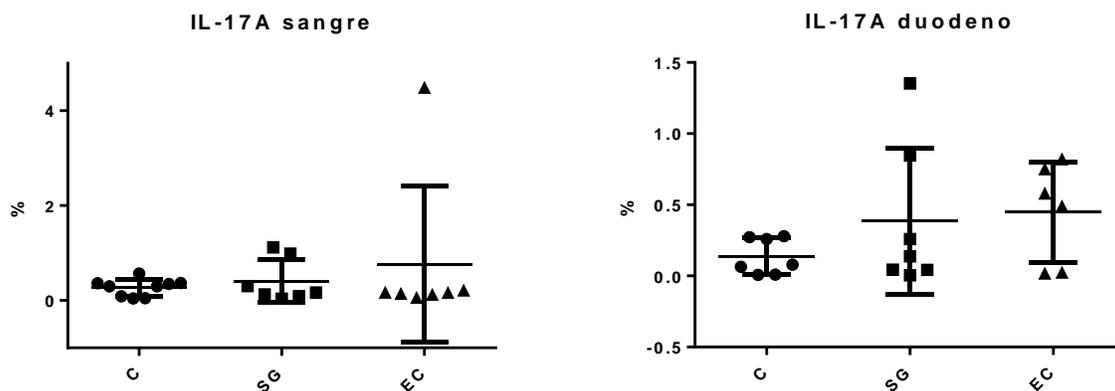


Fig. 12. Porcentaje de células positivas para la citocina IL-17A en muestras de sangre y duodeno. La media se ilustra con una barra. Análisis en sangre: Control (n=9), SG (n=7) y EC (n=7). Análisis en duodeno: Control (n=7), SG (n=7) y EC (n=6).

7.2. Detección de citocinas en tejido duodenal por IHQ

El análisis por IHQ incluyó 32 pacientes: 15 pacientes con EC, 9 pacientes con SGNC y 8 pacientes control. Los resultados de IHQ se expresan como porcentajes de células inmunorreactivas detectadas en epitelio y lamina propia del tejido duodenal en los grupos control y de pacientes con EC y SGNC. Los datos se analizaron mediante el test Holm-Sidak.

7.2.1. Citocinas proinflamatorias en la respuesta inmune de la EC y la SGNC

La detección de IL-1 β en epitelio fue tuvo un mayor porcentaje de células marcadas positivamente para en el grupo de pacientes con EC (15%, $p < 0.01$) y en el de pacientes con SGNC (7.5%, $p = 0.08$) respecto del grupo control (3.5%). En lamina propia el grupo de pacientes con EC (10%) y de pacientes con SGNC (4%) tuvieron un porcentaje significativamente mayor ($p < 0.01$) de células marcadas positivamente con respecto al grupo control, Tabla 3.

Tabla 3. Valores de detección de IL-1 β en tejido duodenal.

IL-1 β	Epitelio						
Grupo	n	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p<0.05
Control	8	1	2	2.5	4.75	10	ns
SGNC	9	2	4	7.5	18.3	25	0.008
EC	15	2	7.5	15	20	25	<0.001
IL-1 β	Lamina propia						
Grupo	n	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p<0.05
Control	8	1	2	2	3.75	8	ns
SGNC	9	1	2.75	4	6	10	<0.001
EC	15	2	7.5	10	13	23	<0.001

La detección de IL-2 mostró un porcentaje significativamente mayor ($p<0.001$) de células marcadas positivamente en epitelio para el grupo de pacientes con SGNC (9.5%) y con EC (26%); en lamina propia también fue significativamente mayor ($p<0.001$) en el grupo de pacientes con SGNC (6%) y con EC (15%) respecto al grupo control, Tabla 4.

Tabla 4. Valores de detección de IL-2 en tejido duodenal.

IL-2	Epitelio						
Grupo	n	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p<0.05
Control	8	0	2	5	6.75	10	ns
SGNC	9	0	5	9.5	14.5	18	<0.001
EC	15	11	20	26	33	43	<0.001
IL-2	Lamina propia						
Grupo	n	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p<0.05
Control	8	0	1	3	5.75	10	ns
SGNC	9	1	4	6	8.25	16	<0.001
EC	15	3	7.75	15	21.3	34	<0.001

La detección de IL-6 en duodeno sólo mostró un porcentaje significativamente mayor en el grupo de pacientes con EC (11%) en lamina propia respecto del grupo control ($p=0.004$) y de pacientes con SGNC ($p=0.006$), Tabla 5.

Tabla 5. Valores de detección de IL-6 en tejido duodenal.

IL-6	Epitelio						
Grupo	n	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p<0.05
Control	8	4	4.25	6.5	9.75	11	ns
SGNC	9	2	3	5.5	11.8	18	ns
EC	15	1	3	8	19	26	ns
IL-6	Lamina propia						
Grupo	n	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p<0.05
Control	8	1	4	5	8	12	ns
SGNC	9	1	3	4.5	8.25	16	ns
EC	15	2	4	11	18	25	0.004/0.006

La detección de IL-8 sólo tuvo un porcentaje significativamente mayor (15.3%) en lamina propia para el grupo de pacientes con EC respecto del grupo control (p=0.046) y de los pacientes con SGNC (p=0.007), Tabla 6.

Tabla 6. Valores de detección de IL-8 en tejido duodenal.

IL-8	Epitelio						
Grupo	n	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p<0.05
Control	8	2	3	4	7.5	21	ns
SGNC	9	1	2	3	5	10	ns
EC	15	1	1.75	4.5	12	25	ns
IL-8	Lamina propia						
Grupo	n	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p<0.05
Control	8	0	1	2	5.75	19	ns
SGNC	9	1	1	1	3.75	10	ns
EC	15	1	2	8	15.3	35	0.046/0.007

La detección de IL-12 tuvo un porcentaje significativamente mayor en el grupo de pacientes con EC (p<0.001) tanto en epitelio (30.5%) como en lamina propia (25.3%) comparado con el grupo control y SGNC. El grupo de pacientes con SGNC mostró un porcentaje mayor (18.3) respecto al grupo control (p<0.001) sólo en epitelio, Tabla 7.

Tabla 7. Valores de detección de IL-12p40 en tejido duodenal.

IL-12p40		Epitelio					
Grupo	n	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p<0.05
Control	8	1	2.5	5.5	7	14	ns
SGNC	9	3	10.3	14.5	18.3	31	<0.001
EC	15	10	15	23.5	30.5	37	<0.001/0.008
IL-12p40		Lamina propia					
Grupo	n	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p<0.05
Control	8	2	4.25	6	8	10	ns
SGNC	9	2	5.75	9	14.5	20	ns
EC	15	1	8	13	25.3	33	<0.001/0.011

La detección de IL-15 en epitelio fue significativamente mayor para los grupos de pacientes con EC (36.5%) y con SGNC (25%) respecto del grupo control ($p<0.001$), aunque el grupo de pacientes con EC tuvo un mayor porcentaje comparado con el grupo de pacientes con SGNC ($p<0.001$). En lamina propia el sólo el grupo de pacientes con EC tuvo un mayor porcentaje (16%) respecto al grupo control ($p=0.003$) y del grupo de pacientes con SGNC ($p=0.001$), Tabla 8.

Tabla 8. Valores de detección de IL-15 en tejido.

IL-15		Epitelio					
Grupo	n	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p<0.05
Control	8	5	6	7.5	9.75	14	ns
SGNC	9	18	22	25	30	38	<0.001
EC	15	19	26	36.5	48.3	61	<0.001/<0.001
IL-15		Lamina propia					
Grupo	n	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p<0.05
Control	8	3	10	10	12	15	ns
SGNC	9	3	6.75	10	12	16	ns
EC	15	4	10	16	25	57	0.003/0.001

La detección de IL-17A tuvo un porcentaje de células marcadas positivamente significativamente mayor ($p<0.001$ y $p=0.022$) sólo en el grupo de pacientes con EC tanto en epitelio (14%) como en lamina propia (10.5%) respecto al grupo control y de grupo de pacientes con SGNC, Tabla 9.

Tabla 9. Valores de detección de IL-17A en tejido duodenal

IL-17A	Epitelio						
Grupo	n	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p<0.05
Control	8	2	4	4.5	8.25	19	ns
SGNC	9	2	7.75	11.5	13	21	ns
EC	15	3	11.8	14	18.3	45	<0.001/0.022
IL-17A	Lamina propia						
Grupo	n	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p<0.05
Control	8	1	2	3	5	12	ns
SGNC	9	0	3.5	5	7.25	19	ns
EC	15	2	7.5	10.5	15.3	27	<0.001/<0.001

La detección de IL-21 fue significativamente mayor ($p<0.001$) en los dos grupos de pacientes con EC (25%) y con SGNC (18%) respecto al grupo control en epitelio, adicionalmente el grupo de pacientes con EC tuvo un mayor porcentaje de células positivas respecto del grupo de pacientes con SGNC ($p<0.001$). En lamina propia sólo el grupo de pacientes con EC (23.5%) tuvo una producción significativamente mayor ($p<0.001$) respecto del grupo control y de pacientes con SGNC, Tabla 10.

Tabla 10. Valores de detección de IL-21 en tejido duodenal.

IL-21	Epitelio						
Grupo	n	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p<0.05
Control	8	3	6	8	12	15	ns
SGNC	9	10	15	18	21	26	<0.001
EC	15	10	19.8	25	30	45	<0.001/<0.001
IL-21	Lamina propia						
Grupo	n	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p<0.05
Control	8	3	8	10.5	12.8	19	ns
SGNC	9	5	7	9.5	17	26	ns
EC	15	8	12.8	23.5	29	36	<0.001/<0.001

En epitelio se detectó un porcentaje significativamente mayor de IL-22 para el grupo de pacientes con EC (23%) respecto del grupo control ($p<0.01$) y de pacientes con SGNC ($p=0.020$); por su parte el grupo de pacientes con SGNC tuvo un porcentaje significativamente mayor (15.5%) respecto del grupo control ($p=0.027$). En lamina propia sólo el grupo de pacientes con EC tuvo un porcentaje

significativamente mayor (11%) respecto del grupo control ($p < 0.001$) y del grupo de pacientes con SGNC ($p = 0.011$), Tabla 11.

Tabla 11. Valores de detección de IL-22 en tejido duodenal.

IL-22	Epitelio						
Grupo	n	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p<0.05
Control	8	3	4.25	6.5	8	10	ns
SGNC	9	1	7.5	15.5	24.3	30	0.027
EC	15	5	11	23	30.3	63	<0.001/0.02
IL-22	Lamina propia						
Grupo	n	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p<0.05
Control	8	1	2	3.5	7.75	14	ns
SGNC	9	1	2	4.5	15.3	27	ns
EC	15	5	10	11	23.5	47	<0.001/0.011

El grupo de pacientes con EC tuvo un porcentaje significativamente mayor de células positivas (20%) para la IL-23 en epitelio respecto del grupo control ($p = 0.001$) y del grupo de pacientes con SGNC ($p < 0.002$). En lamina propia los pacientes con EC tuvieron el mayor porcentaje de células positivas (18%) al compararlo con el grupo control y con el grupo de pacientes con SGNC ($p = 0.004$ y $p < 0.001$). Por su parte el grupo de pacientes con SGNC tuvo un mayor porcentaje de células marcadas positivamente respecto del grupo control ($p < 0.001$) en epitelio (9%) y lamina propia (8%), Tabla 12.

Tabla 12. Valores de detección de IL-23 en tejido duodenal de pacientes con EC y SGNC.

IL-23	Epitelio						
Grupo	n	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p<0.05
Control	8	2	3	4	5.75	7	ns
SGNC	9	5	6	9	10	14	0.002
EC	15	14	17.5	20	21.3	34	<0.001/<0.001
IL-23	Lamina propia						
Grupo	n	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p<0.05
Control	8	1	2	3	5.75	6	ns
SGNC	9	4	6.75	8	12.5	16	0.004
EC	15	12	16	18	28	36	<0.001/<0.001

En la detección de IFN- γ se encontró que sólo el grupo de EC tuvo un porcentaje significativamente mayor de células positivas respecto del grupo control y el grupo de pacientes con SGNC ($p < 0.001$) en epitelio (8.5%) y lamina propia (7%), Tabla 13.

Tabla 13. Valores de detección de IFN- γ en tejido duodenal

IFN- γ		Epitelio					
Grupo	n	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p<0.05
Control	8	0	0	1	2	10	ns
SGNC	9	1	2	3	5	7	ns
EC	15	1	3.75	8.5	19.75	32	<0.001
IFN- γ		Lamina propia					
Grupo	n	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p<0.05
Control	8	0	0	1.5	3.75	8	ns
SGNC	9	0	1	2	3	7	ns
EC	15	1	4	7	13	25	<0.001

La detección de TNF- α en epitelio fue significativamente mayor en el grupo de pacientes con EC (18%) comparado con el grupo control ($p < 0.001$) y SGNC ($p = 0.009$). En lamina propia el porcentaje de células positivas sólo fue significativamente mayor ($p = 0.002$) para el grupo de pacientes con EC (13.5%). La detección de TNF- α en el grupo de pacientes con SGNC sólo fue significativamente mayor ($p = 0.046$) a nivel de epitelio (12%) respecto del grupo control, Tabla 14.

Tabla 14. Valores de detección de TNF- α en tejido duodenal

TNF- α		Epitelio					
Grupo	n	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p<0.05
Control	8	0	4.75	7	10	18	ns
SGNC	9	4	9	12	19.8	24	0.046
EC	15	7	14	18	24.3	49	<0.001/0.009
TNF- α		Lamina propia					
Grupo	n	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p<0.05
Control	8	0	2	4	6.75	16	ns
SGNC	9	1	5	8	16	22	ns
EC	15	3	6	13.5	19.3	26	0.002

7.2.2. Citocinas anti-inflamatorias en la respuesta inmune de EC y la SGNC

Los resultados obtenidos en la detección de IL-4 no fueron significativos en los grupos de estudio, Tabla 15.

Tabla 15. Valores de detección de IL-4 en tejido duodenal

IL-4		Epitelio					
Grupo	n	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p<0.05
Control	8	4	5	6	7.75	10	ns
SGNC	9	0	5	6.5	13.25	29	ns
EC	15	2	3	7	19.25	31	ns
IL-4		Lamina propia					
Grupo	n	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p<0.05
Control	8	4	5	7.5	10	14	ns
SGNC	9	1	3.75	7.5	10	12	ns
EC	15	0	3	5	20.25	42	ns

En la detección de células positivas para IL-10 se observa un porcentaje significativamente menor en el grupo de pacientes con SGNC (5%) respecto del grupo control ($p=0.024$) y del grupo de pacientes con EC ($p=0.03$) en lamina propia, Tabla 16.

Tabla 16. Valores de detección de IL-10 en tejido duodenal

IL-10		Epitelio					
Grupo	n	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p<0.05
Control	8	10	13.3	16.5	19.8	23	ns
SGNC	9	3	6.5	9.5	19.3	48	ns
EC	15	6	12	18	40.5	71	ns
IL-10		Lamina propia					
Grupo	n	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p<0.05
Control	8	4	10.5	19.5	22.8	26	ns
SGNC	9	1	2	5	16.3	23	0.024/0.03
EC	15	2	9.75	16	24.3	43	Ns

7.2.3. Citocinas fibrogénicas en la respuesta inmune de la EC y la SGNC

de pacientes con EC y SGNC. Los resultados en la detección a nivel de epitelio nos muestra que el grupo de pacientes con SGNC y con EC tienen una mayor producción de TGF- β 1 en comparación con el grupo control ($p < 0.001$) en epitelio. En lamina propia hubo una producción significativamente mayor de los pacientes con EC ($p = 0.009$) y los pacientes con SGNC ($p = 0.001$) respecto del grupo control, Tabla 17.

Tabla 17. Valores de detección de TGF- β 1 en tejido duodenal.

TGF- β	Epitelio						
Grupo	n	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p<0.05
Control	8	0	2.25	6	10	17	Ns
SGNC	9	11	15.5	18	30	38	<0.001
EC	15	2	9	17.5	24.25	39	<0.001
	Lamina propia						
Grupo	n	Mínimo	Percentil 25	Mediana	Percentil 75	Máximo	p<0.05
Control	8	0	0.25	3.5	7.5	15	Ns
SGNC	9	5	8	10.5	15.75	22	0.009
EC	15	1	5.75	11.5	19.25	29	0.001

8. Discusión

La Enfermedad Celiaca es una patología crónica autoinmune que afecta intestino delgado de individuos genéticamente predispuestos y se desencadena por la ingesta de gluten (Ludvigsson, *et al.*, 2013). A la fecha el único tratamiento disponible es la dieta libre de gluten (DLG), sin embargo recientemente se ha detectado otro grupo de pacientes que responden a este tratamiento mejorando su estado de salud pero que no cumplen con los criterios diagnósticos para Enfermedad Celiaca, a este grupo se le clasifica como pacientes con Sensibilidad al Gluten no Celiaca (Kabbani, *et al.*, 2014).

Entre ambas patologías existe una diferencia importante en la prevalencia, para EC es de 0.5%- 1% mientras que para la SGNC se manejan valores del 0.63%-6% (Navarro y Araya, 2015).

En este estudio se buscó identificar parámetros inmunológicos que nos ayuden a diferenciar entre la EC y la SGNC así como comprender su fisiopatología. Este trabajo evidencia respuestas inmunológicas diferenciales al gluten en estas dos condiciones clínicas.

Este objetivo se abordó mediante la identificación de fenotipos de linfocitos Th en las patologías de la EC y la SGNC. Ya que en la EC se tiene reportado como principal fenotipo de la inflamación a los linfocitos Th1, nosotros quisimos investigar el papel de los linfocitos Th17, debido a que se han relacionado con mecanismos de autoinmunidad y que el proceso inflamatorio se desarrolla en el intestino. La patogénesis de la SGNC es poco conocida debido a su reciente descubrimiento y a que comparte muchas características clínicas con la EC. Hasta el momento se sabe de una participación importante de la inmunidad innata, pero al evaluar marcadores de inmunidad adaptativa tratamos de conocer más características de esta nueva entidad clínica.

Uno de los principales cambios histológicos reportados por diferentes autores en la EC es la infiltración de LIE (Villar Rodríguez, 2005), lo que concuerda con lo observado por nuestro grupo mediante la identificación de linfocitos T CD4+. A través del análisis por citometría de flujo se determinó el fenotipo de linfocitos T cooperadores en muestras de sangre y tejido duodenal en donde se observó un

mayor infiltrado de linfocitos T CD4+ en las muestras de tejido duodenal de pacientes con EC ($p=0.0025$) respecto del grupo control (Sapone, 2012).

En el estudio de Garrote *et al.*, evaluaron las vías de activación de IFN- γ dependiente del consumo de gluten en biopsias duodenales, mediante el análisis de las vías STAT que se activan en la respuesta inmune adaptativa de la EC. Ellos detectaron citocinas y proteínas STAT involucradas en los eventos tempranos de la EC. Sólo encontraron un incremento en IL-21 e IL-27p28, en nuestros resultados también encontramos un incremento de IL-21 en los grupos de pacientes con EC y pacientes con SGNC. Mientras que Garrote *et al.*, no encontraron un papel significativo para IL-12, IL-23p19 e IL-6. A pesar de encontrar una expresión diferencial de STAT3 en EC activa, no le dan ningún peso ni a la señalización por IL-23, ambas relacionadas con el perfil de linfocitos Th17. También encontraron una expresión diferencial de STAT5 relacionada con la diferenciación de linfocitos Treg pero no una producción de citocinas anti inflamatorias en pacientes celíacos.

Hablan de una falla en el control de la inflamación como uno de los factores involucrados en la pérdida de tolerancia al gluten pero no encuentran expresión diferencial de marcadores anti inflamatorios en sus arreglos de baja densidad. Este trabajo difiere al nuestro en la metodología utilizada para detectar la red de citocinas implicadas y a pesar de que este grupo analiza cientos de genes mediante arreglos de baja densidad y qPCR, sólo encuentra una activación importante de genes relacionados con la respuesta Th1, a diferencia de nuestros resultados en donde la respuesta Th17 también se observa activada, esto puede deberse a la que la detección de las citocinas se hizo a nivel de proteínas mediante IHQ. El grupo no discute sobre las características poblacionales de su grupo de estudio, sólo que al igual que nosotros son adultos (Garrote JA, *et al.*, 2008).

Antes del descubrimiento del linaje Th17 en la EC se sólo se reportaban modificaciones en poblaciones de linfocitos Th1 y en sus citocinas características. El grupo de Harris, *et al.*, fue uno de los primeros trabajos en reportar un aumento en la producción de IL-1 β , IL-23 y TNF- α , citocinas relacionadas con la respuesta

Th17, en pacientes celíacos HLA-DQ2+ en comparación con pacientes HLA-DQ2+ sanos. En nuestros resultados tanto IL-1 β como IL-23 se encontraron elevadas en el grupo de EC por encima del grupo de SGNC y del control, pero también los pacientes con SGNC presentaron una mayor producción de ambas citocinas a nivel de intestino. Adicionalmente, este grupo analizó la producción de otras citocinas en CMSP, en el caso de IL-12p70 no encontraron una producción significativa, mientras que en nuestra detección de IL-12p40 encontramos a nivel de intestino una mayor producción en el grupo de EC, seguida por el grupo de SGNC. Respecto de las citocinas relacionadas con la respuesta Th17 el TNF- α tuvo una mayor producción en los pacientes celíacos, lo que concuerda con nuestra detección en intestino, cabe mencionar que la producción en epitelio intestinal los pacientes con SGNC también produjeron más TNF- α de manera significativa. Las diferencias respecto a este trabajo pueden relacionarse a que ocuparon CMSP de pacientes HLA-DQ2+ sanos en cultivo con gliadina y el análisis de citocinas y quimiocinas se realizó mediante ELISA. Estas características difieren mucho de nuestro trabajo ya que las muestras que analizamos provienen de pacientes HLA-DQ8+ primordialmente y al tener una patología activa, muchos genes de vías proinflamatorias están activos, algo que no se encuentra en pacientes sanos (Harris, *et al.*, 2008).

El uso de la citometría de flujo en el diagnóstico, monitoreo e investigación de la EC ha tenido muchos avances en los últimos años. La fenotipificación de los IELs es de relevancia clínica dado el aumento de IELs CD3+ ($\alpha\beta$ y $\gamma\delta$) y la reducción en IELs CD3-. Los biomarcadores de IEL también son útiles en la valoración de la respuesta a la DLG y en el diagnóstico de complicaciones severas de la EC. La valoración de biomarcadores diagnósticos y pronósticos por citometría de flujo tiene una amplia versatilidad y aplicabilidad en la investigación y estudios clínicos de tejidos sólidos (Leon, 2011).

De los marcadores analizados por citometría sólo los relacionados con la respuesta Th17 fueron más altos para el grupo de EC, lo cual corresponde con el trabajo de Monteleone *et al.*, en donde se han caracterizado linfocitos productores

de IL-17 en la mucosa intestinal. Este grupo detectó la producción de altos niveles de IL-21 en la EC activa, lo que coincide con nuestra detección en tejido duodenal. También encontraron que gran cantidad de la IL-17A es secretada principalmente por linfocitos CD4+ y CD4+CD8+ que también secretan IFN- γ , pero que carecen del marcador CD161. Nuestro grupo no llevo a cabo una fenotipificación tan amplia de los linfocitos Th17 pero si concuerda con la detección de linfocitos Th17 en intestino así como la presencia de altos niveles de IL-21 que genera una señalización positiva y autócrina para reforzar la diferenciación hacia el linaje Th17. También en este trabajo se discute la diferenciación *in situ* de linfocitos Th17, donde se menciona que no hay evidencias de la expresión y actividad de TGF- β 1 e IL-23 en la mucosa de pacientes con EC, sin embargo en nuestros resultados se detectaron más altas significativamente ambas citocinas para el grupo de EC. Este grupo realiza la detección de citocinas mediante PCR en tiempo real, ELISA y CF lo que le da mayor peso a sus resultados. En su grupo de estudio incluyeron EC inactiva, encontrando resultados comparables con su grupo control. Realizaron cultivos celulares para aislar a partir de estos los linfocitos de lamina propia utilizados para sus detecciones en CF, cabe mencionar que ellos realizan una estimulación de los linfocitos con PMA y Ionomicina, algo que nosotros decidimos no utilizar en nuestras determinaciones por CF (Monteleone, *et al.*, 2010 y Gaffen, 2008).

El grupo de Sapone *et al.*, encontró sólo expresión significativamente alta de IL-17A en los pacientes celíacos respecto de pacientes con SGNC y controles. Esto concuerda con nuestros resultados obtenidos por CF e IHQ, donde sólo obtenemos una expresión de IL-17A significativamente alta en el grupo de EC. La detección de esta citocina se realizó mediante RT-PCR y además por IHQ al igual que nuestro grupo (Sapone, *et al.*, 2010).

Brottveit *et al.*, analizaron la secreción de citocinas de la mucosa intestinal de 30 pacientes con SGNC HLA-DQ2⁺ y de 15 pacientes con EC, sometidos a un reto con gluten de 3 días. Al inicio de la discusión de sus resultados se plantea que la respuesta de linfocitos T sólo es detectable en sangre para la EC pero no para la SGNC, por lo que todas sus determinaciones se realizaron con muestras de tejido

duodenal, sin embargo en nuestro trabajo fuimos capaces de detectar marcadores de linfocitos Th17 en muestras de sangre periférica en pacientes con SGNC. En los resultados del grupo de SGNC encuentran un incremento de LIE antes y después de su reto con gluten, lo que concuerda con nuestros resultados por citometría de flujo al detectar un aumento en poblaciones de linfocitos T en los grupos de EC y SGNC en muestras de tejido duodenal. En los pacientes con sensibilidad al gluten encontraron una expresión significativamente alta de IFN- γ , pero en nuestros resultados no detectamos de manera significativa la secreción de esta citocina. Para el grupo de EC detectaron elevado el TNF- α , citocina secretada principalmente por MO e implicada en diversas enfermedades autoinmunes. En el análisis realizado por nuestro grupo se elevó la secreción de esta citocina en ambos grupos de pacientes EC y SGNC respecto del control, siendo los celíacos los que poseen la mayor secreción. Se detectó una alta secreción de IL-8 en pacientes celíacos, lo que coincide con nuestros resultados y se relaciona con la activación de MO y NO. Las diferencias con nuestros resultados pueden deberse primero al fondo genético de la población de estudio, ya que la población de nuestro estudio es HLA-DQ8+ y además que su detección de citocinas fue mediante qRT-PCR (Brottveit, *et al.*, 2013).

El grupo de Sapone *et al.*, abordan la similitudes y diferencias entre la EC y la SGNC como la diversidad con el que el sistema inmune reacciona a la gliadina. Uno de sus objetivos fue obtener conocimiento sobre la respuesta inmune al gluten en la SGNC comparada con la EC, mediante el análisis de las vías de inmunidad innata y adaptativa activadas en estas patologías. Los pacientes con SGNC carecen de una asociación clara entre el haplotipo del MHC, lo que les llevó a hipotetizar que el sistema inmune adaptativo no está involucrado de manera crítica en su patogénesis. Para sustentar este argumento se analizaron marcadores de respuesta inmune innata y adaptativa en mucosa de intestino delgado. Encontrando un infiltrado de LIE en la SGNC menor que el de la EC pero mayor que el grupo control. Destaca que todos, excepto 4 pacientes con SGNC tienen número de LIE por encima del rango aceptado como normal, sugiriendo un papel para el sistema inmune adaptativo patológicamente significativo en estos

pacientes con SGNC. Para analizar el papel de la inmunidad adaptativa en la SGNC se analizó la expresión de las citocinas IL-6, IFN- γ e IL-21 en biopsias de intestino delgado, encontrando sólo una expresión significativa para IL-6 en la EC lo que concuerda con nuestros resultados obtenidos por IHQ dónde la expresión de IL-6 sólo es mayoritaria para los celíacos. Sin embargo para IFN- γ nuestro grupo sí detectó una expresión mayor en la EC. En la IL-21 encontramos una expresión alta significativa en los grupos de EC y de SGNC por encima del grupo control, sólo a nivel del epitelio. Respecto a la expresión de genes asociados a linfocitos Treg sólo en el grupo de SGNC se observó una expresión disminuida de Foxp3 y de TFGFB1. En nuestros resultados pudimos observar sólo una tendencia de mayor expresión de Foxp3 en linfocitos de sangre periférica para el grupo de SGNC y por parte de los pacientes celíacos en duodeno, mientras que en intestino no se aprecian diferencias entre los grupos. Respecto a la producción de TGF- β 1 ellos no reportan diferencias entre los grupos de estudio, sin embargo nosotros encontramos un aumento en los pacientes con SGNC aunque el grupo de EC también lo presentó pero en menor proporción, lo que puede sugerir un mayor nivel activación y reclutamiento de linfocitos Treg en la SGNC a nivel sistémico y de mucosa, así como un papel del TGF- β 1 en la regulación de la respuesta inmune adaptativa en la SGNC. Este trabajo incluyó un número alto de pacientes, 26 con SGNC, 42 con EC y 39 controles, lo que puede influir en las diferencias con nuestros resultados, además que la detección sólo se realizó mediante qPCR (Sapone, *et al.*, 2011).

Se ha confirmado un papel central de la inmunidad adaptativa en la EC al demostrarse la expresión sistémica y a nivel de GALT (mucosas) de citocinas asociadas con las respuestas Th1 y Th17. En contraste en la SGNC no se ha encontrado la expresión de marcadores de inmunidad adaptativa, de manera particular IL-17A, IL-6, IL-21, IFN- γ ; en biopsias intestinales. Debido a la obtención de estos resultados se tiene la hipótesis de la SGNC se genera principalmente por mecanismos de inmunidad innata. La expresión de TLR2, TLR1 y TLR4; es mayor en pacientes con SGNC que en pacientes con EC. También la expresión del factor

de transcripción Foxp3 es menor en el intestino delgado de pacientes con SGNC en comparación con EC; lo que se ha interpretado con pérdida de la homeostasis intestinal lo que favorecería el desarrollo de condiciones de autoinmunidad en el intestino; sin embargo estos resultados son controversiales ya que otros estudios a nivel sistémico e intestinal muestran este marcador elevado en pacientes con EC. La reducción en la expresión de Foxp3 también se ha interpretado como una baja activación de inmunidad adaptativa en comparación con los pacientes celíacos (Volta, *et al.*, 2013).

El papel de la regulación de la respuesta inmune de mucosa intestinal es primordial, debido a que una alteración en su función puede generar la pérdida de la tolerancia oral, en este caso hacia el gluten. Basado en esto Zanzi *et al.*, estudiaron la presencia y función de los linfocitos Treg y su efecto en la EC. Ellos se centraron el papel del factor de transcripción Foxp3, encontrando que existe una mayor densidad de linfocitos Treg en el intestino de pacientes celíacos, debido a una diferenciación *in situ* inducida por la gliadina, nuestros por citometría de flujo nos muestran sólo una tendencia en el aumento de la expresión de Foxp3 en Ec y SGNC. También analizaron la función de linfocitos Treg en presencia de IL-15, una citocina con altas concentraciones en esta patología (Abadie y Jabri 2014), encontrando una falla en su capacidad reguladora en presencia de esta citocina. En nuestras detecciones encontramos un aumento en la producción de IL-15 en los grupos de EC y SGNC, presentando la mayor producción de esta citocina los pacientes celíacos. Por lo que a pesar de existir una alta densidad de linfocitos Treg su función reguladora es debilitada por la presencia de IL-15, generando una falla en los mecanismos supresores de este linaje linfocitario y contribuyendo a la expansión de la respuesta inflamatoria (Zanzi, *et al.*, 2011).

Se reportado una alta producción de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 e IL-4 en la EC, sin embargo en nuestros resultados por IHQ encontramos una tendencia en el caso de IL-4, sólo se puede observar un aumento en la producción en el grupo de EC sin ser estadísticamente significativo. La producción de IL-10 por el

contrario se encontró reducida significativamente en el grupo de SGNC por debajo del grupo control y de EC (Lahat, *et al.*, 1999).

9. Conclusiones

En el proceso inflamatorio de la EC están presentes los linfocitos Th17 como pudo evidenciarse por su presencia en sangre y tejido por la expresión de su factor de transcripción maestro ROR- γ t y la producción de IL-17A en estas células. Mientras que en la SGNC no se pudo identificar un fenotipo linfocitario dominante.

En la SGNC se producen citocinas de tipo proinflamatorio que indican el desarrollo de mecanismos de inmunidad adaptativa relacionados con respuestas diversas: Th1, Th17 y de tolerancia.

El proceso inflamatorio de la SGNC parece ser menos intenso ya que citocinas como: IL-6, IL-8, IL-17A e IFN- γ ; no fueron detectadas en las muestras de sangre y tejido de este grupo de pacientes y en todas las citocinas pro-inflamatorias detectadas sus niveles fueron por debajo de los detectados para EC.

Este trabajo contribuye al conocimiento de los padecimientos relacionados con gluten en México, ya que estas patologías son prácticamente desconocidas. A pesar de que el fondo genético de nuestra población se caracteriza por la expresión del haplotipo del HLA-DQ8, varios resultados coinciden con trabajos realizados primordialmente en poblaciones con haplotipos HLA-DQ2.

10. Literatura citada

1. Abadie V y Jabri B. IL-15: a central regulator of celiac disease immunopathology. *Immunol Rev*, 2014; 260: 221-234.
2. Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB y Jabri B. Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annu Rev Immunol* 2011. 29:493–525.7.
3. Bai JC, , Fried M, Corazza GR, Schuppan D, Farthing M, Catassi C, Greco L, Cohen H, Ciacci C, Eliakim R, Fasano A, González A, Krabshuis JH, LeMair A. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines on Celiac Disease. *WGO*, 2012; 1-25.
4. Barone MV, Troncone R y Auricchio S. Gliadin peptides as triggers of the proliferative and stress/innate immune response of the celiac small intestinal mucosa. *Int J Mol Sci*, 2014; 15: 20518-20537.
5. Belkaid Y y Hand TW. Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Cell*, 2014; 157 (1): 121-141.
6. Berin MC y Mayer L. Immunophysiology of experimental food allergy. *Mucosal Immunol*, 2009; 2 (1):
7. Brianni C, Samaroo D y Alaedini A. Celiac disease: From gluten to autoimmunity. *Autoimmunity Rev*, 2008; 7:644–650.
8. Brottveit M, Beitnes A-CR, Tollefsen S, Bratlie JE, Jahnsen FL, Johansen F-E, Sollid LM y Lundin KEA. Mucosal cytokine response after short-term gluten challenge in Celiac Disease and Non-Celiac Gluten Sensitivity. *Am J Gastroenterol*, 2013; 108: 842-850.
9. Caio G, Volta U, Tovoli F y De Giorgio R. Effect of gluten free diet on immune response to gliadin in patients with non-celiac gluten sensitivity. *BMC Gastroenterol*, 2014; 14:26.
10. Carroccio A, Mansueto P, Iacono G, Soresi M, D'Alcamo A, Cavataio F, Brusca I, Florena AM, Ambrosiano G, Seidita A, Pirrone G y Rini GB. Non-Celiac Wheat Sensitivity diagnosed by double-blind placebo-controlled challenge: exploring a new clinical entity. *Am J Gastroenterol*, 2012; 107:1898-1906.

11. Catassi C, Bai JC, Bonaz B, Bouma G, Calabró A, Carroccio A, Castillejo G, Ciacci C, Cristofori F, Dolinsek J, Francavilla R, Elli L, Green P, Holtmeier W, Koehler P, Koletzko S, Meinhold C, Sanders D, Schumann M, Schuppan D, Ullrich R, Vécsei A, Volta U, Zevallos V, Sapone A y Fasano A. Non-Celiac Gluten Sensitivity: The New Frontier of Gluten Related Disorders. *Nutrients*, 2013; 5: 3839-3853.
12. Comerford R, Coates C, Byrne G, Lynch S, Dunne P, Dunne M, Kelly J y Feighery C. Characterisation of tissue transglutaminase-reactive T cells from patients with coeliac disease and healthy controls. *Clin Immunol*, 2014;154(2):155-163.
13. Czaja-Bulsa G. Non coeliac gluten sensitivity – A new disease with gluten intolerance. *Clin Nutrition*, 2014; XXX: 1-6.
14. Frisullo G, Nociti V, Iorio R, Patanella AK, Marti D, Cammarota G, Tonale PA y Batochi AP. T-bet and pSTAT-1 expression in PBMC from coeliac disease patients: new markers of disease activity. *Clin Exp Immunol*, 2009; 106–114.
15. Gaffen SL. An overview of IL-17 function and signaling. *Cytokine*, 2008; 43: 402-407.
16. Gaffen SL, Jain R, Garg AV y Cua DJ. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat Rev Immunol*, 2014; 14: 585-600.
17. Garrote JA, Gómez-González E, Bernardo D, Arranz E y Chirido F. Celiac Disease Pathogenesis: The Proinflammatory Cytokine Network. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2008; 47: S27-S32.
18. Gasbarrini GB y Mangiola F. Wheat related disorders: A broad spectrum of 'evolving' diseases. *UEG J*, 2014; 2(4): 254–262.
19. Gujral N, Freeman HJ y Thomson ABR. Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *WJG*, 2012; 42: 6036-6059.
20. Guzmán-Flores JM y Portales-Pérez DP. Mecanismos de supresión de las células T reguladoras (Treg). *Gac Med Mex*, 2013; 149:630-8.

21. Harris KM, Fasano A, Mann DL. Monocytes differentiated with IL-15 support Th17 and Th1 responses to wheat gliadin: Implications for celiac disease. *Clin Immunol*, 2008; 135: 430–439.
22. Harrison OJ y Powrie F. Regulatory T Cells and Immune Tolerance in the Intestine. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013; 5: a018341.
23. Hmida NB, Ahmed MB, Moussa A, Rejeb MB, Said Y, Kourda N, Meresse B, Abdeladhim M, Louzir H y Cerf-Bensussan N. Impaired control of effector T cells by regulatory T cells: a clue to loss of oral tolerance and autoimmunity in Celiac Disease? *Am J Gastroenterol*, 2012; 107:604–611.
24. Izcue A, Coomber JL y Powrie F. Regulatory Lymphocytes and Intestinal Inflammation. *Annu Rev Immunol*, 2009; 27: 313-338.
25. Kabbani TA, Vanga RR, Leffler DA, Villafuerte-Galvez J, Pallav K, *et. al.* Celiac disease or Non-celiac gluten sensitivity? An approach to clinical differential diagnosis. *Am J Gastroenterol*, 2014; 109:741-746.
26. Kamada N, Seo S-U, Chen GY y Núñez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*, 2013; 13 (5): 321-335.
27. Kenrick K y Day AS. Coeliac disease: where are we in 2014? *Australian Fam Phys*, 2014; Vol. 43, No. 10.
28. Koning G. Celiac disease: quantity matters. *Semin Immunopathol*, 2012; 34: 541-549.
29. Kumar P y Subramaniyam G. Molecular underpinnings of Th17 immune-regulation and their implications in autoimmune diabetes. *Cytokine*, 2015; 71(2):366-376.
30. Kupfer SS y Jabri B. Celiac disease pathophysiology. *Gastrointest Endosc Clin N Am*, 2012 October; 22(4):6.
31. Lahat N, Shapiro S, Karban A, Gerstein R, Kinarty A y Lerner A. Cytokine Profile in Coeliac Disease. *Scand J Immunol*, 1999; 49: 441–446.
32. Leon F. Flow cytometry of intestinal intraepithelial lymphocytes in celiac disease. *J Immunol Methods*, 2011; 363 (2): 177-186.

33. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PHR, *et al.* The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*, 2013; 62:43-52.
34. Lundin KEA. Non-celiac gluten sensitivity- why worry? *BMC Med*, 2014; 12:86.
35. McAllister CS y Kagnoff MF. The immunopathogenesis of celiac disease reveals possible therapies beyond the gluten-free diet. *Semin Immunopathol*, 2012; 34:581–600.
36. Meresse B, Ripoché J, Heyman M y Cerf-Bensussan N. Celiac disease: from oral tolerance to intestinal inflammation, autoimmunity and lymphomagenesis. *Nat Muc Immunol*, 2008; 2(1):8-23.
37. Molina-Infante J, Santolaria S, Montoro M, Esteve M y Fernández-Bañares F. Non-celiac gluten sensitivity: a critical review of current evidence. *Gastroenterol Hepatol*, 2014; 37(6): 362-371.
38. Montalvillo-Álvarez E. Linfocitos Intraepiteliales y Células Dendríticas: Distribución y utilidad en el diagnóstico y en la modulación de la respuesta inmunitaria intestinal. Tesis Doctoral. Valladolid: Universidad de Valladolid, Facultad de Medicina, 2014.
39. Monteleone I, Sarra M, Del Vecchio Blanco G, Paoluzi OA, Franzè E, Fina D, Fabrizi A, MacDonald TT, Pallone F y Monteleone G. Characterization of IL-17A-Producing cells in Celiac Disease mucosa. *J Immunol*, 2010; 184: 2211-2218.
40. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*, 2003; 3 (4): 331-341.
41. Navarro E y Araya M. Sensibilidad no celíaca al gluten. Una patología más que responde al gluten. *Rev Med Chile*, 2015; 143:619-626.
42. Nijeboer P, Bontkes HJ, Mulder CJJ y Bouma G. Non-celiac Gluten Sensitivity. Is it the Gluten or the Grain? *J Gastrointest Liver Dis*, 2013; 22 (4): 435-440.
43. Pabst O y Mowat AM. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol*, 2012; 5 (3): 232-239.

44. Pesenacker AM, Broady R y Levings MK. Control of tissue-localized immune responses by human regulatory T cells. *Eur J Immunol*, 2014; 00: 1-11.
45. Peterson LW y Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 2014; 14 (3): 141-153.
46. Remes-Troche JM, Ramírez-Iglesias MT, Rubio-Tapia A, Alonso-Ramos A, Velazquez A y Uscanga LF. Celiac Disease could be a frequent disease in Mexico: Prevalence of tissue transglutaminase antibody in healthy blood donors. *J Clin Gastroenterol*, 2006; 40:697–700.
47. Remes-Troche JM, Nuñez-Alvares C y Uscanga-Domínguez LF. Celiac disease in mexican population: an update. *Am J Gastroenterol*, 2013; 108(2):283-4.
48. Sapone A, Lammer KM, Mazzarella G, Mikhailenko I, Cartenì M, Casolaro V y Fassano A. Differential mucosal IL-17 expression in two gliadin-induced disorders: Gluten sensitivity and the autoimmune enteropathy Celiac Disease. *Int Arch Immunol*, 2010; 152: 75-80.
49. Sapone A, Lammers KM, Casolaro V, Cammarota M, Giuliano MT, De Rosa M, Stefanile R, Mazzarella G, Tolone C, Russo MT, Esposito P, Ferraraccio F, Cartenì M, Riegler G, de Magistris L y Fasano A. Divergence of gut permeability and mucosal gene expression in two gluten associated conditions: celiac disease and gluten sensitivity. *BMC Med*, 2011; 9(23):1-11.
50. Schuppan D, Junker Y y Barisani D. Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterol*, 2009; 137:1912-1933.
51. Shabgah AG, Fattahi E y Shahneh FZ. Interleukin-17 in human inflammatory diseases. *Postep Derm Alergol*, 2014. XXXI, 4: 256–261.
52. Singh RP, Hasanb S, Sharma S, Nagra S, Yamaguchi DT, Wong DTW, Hahn BH, Hossain A. Th17 cells in inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Revi*, 2014;13:1174–1181.

53. Sjöberg V, Sandström O, Hedberg M, Hammarström S, Hernell O y Hammarström M-L. Intestinal T-Cell Responses in Celiac disease – Impact of Celiac Disease Associated Bacteria. PLoS ONE, 2013; 8 (1): e53414
54. Sollid LM y Jabri B. Celiac disease and transglutaminase 2: Model for posttranslational modification of antigens and HLA association in the pathogenesis of autoimmune disorders. Curr Opin Immunol, 2011; 23(6): 732-738.
55. Stepniak D y Koning F. Celiac disease-Sandwiched between innate and adaptive immunity. Human Immunol, 2006; 67, 460–468.
56. Strugnell RA y Wijburg OLC. The role of secretory antibodies in infection immunity. Nat Rev Microbiol, 2010; 8 (9): 656-667.
57. Tonutti E y Bizzaro N. Diagnosis and classification of celiac disease and gluten sensitivity. Autoimmun Rev, 2014; 13: 472-476.
58. Tovoli F, Masi C, Guidetti E, Negrini G, Paterini P y Bolondi L. Clinical and diagnostic aspects of gluten related disorders. World J Clin Cases, 2015; 3 (3): 275-284.
59. Vargas Pérez ML, Morell Bernabé JJ, González Roiz C y Melero Ruiz J. Avances en la patogenia y en el diagnóstico inmunológico de la enfermedad celíaca. Protocolos diagnósticos en Atención Primaria. Rev Pediatr Aten Primaria 2004; 6: 443-462.
60. Villar Rodríguez JL. Enfermedad Celíaca. Estudio Anatomopatológico. Ciencia Pediatr. 2005; 25, 2: 21-22.
61. Volta U, Giacomo C, Tovoli F y De Giorgio R. Non-celiac gluten sensitivity: questions still to be answered despite increasing awareness. Cell & Molec Immunol, 2013; 10: 383-392.
62. Zanzi D, Stefanile R, Santagata S. IL-15 interferes with suppressive activity of intestinal regulatory T cell expanded in Celiac Disease. Am J Gastroenterol, 2011; 106:1308-1317.