



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

Trabajo Fin de Máster

**ESTUDIO *IN VITRO* SOBRE LOS
EFECTOS CELULARES E
INMUNOLÓGICOS DE PÉPTIDOS
DEL GLUTEN EN LA
ENFERMEDAD CELÍACA**

Alumna: Ponce de León Collado, Candelaria

Tutora: Torres López, María Isabel

Dpto: Biología experimental

Área: Biología celular

Noviembre, 2015

ÍNDICE

1. Resumen.....	3
2. Abstract.....	3
3. Introducción.....	4
3.1. Enfermedades gastrointestinales de base inmune.....	4
3.2. Enfermedad celíaca.....	4
3.2.1. Efectos inmunomoduladores de los péptidos del gluten.....	7
3.2.2. Citotoxicidad del gluten no mediada por el sistema inmune.....	8
3.2.2.1. Efectos del gluten en el estrés oxidativo.....	8
3.2.3. Factor nutricional en la enfermedad celíaca.....	10
3.2.3.1. Ácidos grasos.....	10
4. Justificación y objetivos.....	11
5. Materiales y métodos.....	12
5.1. Modelos celulares.....	12
5.2. Cultivos celulares.....	12
5.3. Péptidos y digestión de la gliadina.....	13
5.4. Pre-tratamientos.....	14
5.4.1. Glutación.....	14
5.4.2. Ácido Docosaexanoico.....	14
5.5. Tratamientos.....	14
5.6. Procedimiento experimental.....	15
5.7. Determinación de la proliferación celular.....	16
5.8. Determinación del IFN- γ	17
5.9. Método de medición con fluorocromos y análisis por citometría.....	17
5.9.1. Determinación del ciclo celular.....	17

5.9.2. <i>Determinación de las especies reactivas del oxígeno</i>	18
5.9.3. <i>Evaluación del estado de la membrana plasmática</i>	18
6. Resultados	19
6.1. <i>Determinación de la proliferación celular</i>	19
6.2. <i>Determinación del IFN-γ</i>	21
6.3. <i>Análisis del ciclo celular</i>	23
6.3.1. <i>Línea celular monocítica U937</i>	23
6.3.2. <i>Línea celular epitelial Caco-2</i>	26
6.4. <i>Especies reactivas del oxígeno</i>	29
6.4.1. <i>Línea celular monocítica U937</i>	29
6.4.2. <i>Línea celular epitelial Caco-2</i>	31
6.5. <i>Desorganización de la membrana plasmática de células U937</i>	33
7. Discusión	35
8. Conclusiones	40
9. Bibliografía	42
10. Resumen de asignaturas	49
11. Curriculum vitae	55

1. RESUMEN

La enfermedad celíaca es un trastorno autoinmune que puede desarrollarse en personas genéticamente predispuestas, donde la ingestión de gluten lleva al daño en el intestino delgado. La gliadina, la fracción proteica del gluten, tiene un efecto dual sobre las células; por un lado, los péptidos tóxicos inducen una respuesta inmunológica innata caracterizada por la producción de IL-15 por los enterocitos ayudando a mantener la respuesta innata y, por otro, los péptidos inmunogénicos, los cuales contienen epítomos que inducen la respuesta adaptativa por la estimulación de las células T. Con el objetivo de realizar un estudio *in vitro* sobre el efecto de los péptidos sintéticos, 33-mer y 19-mer, así como la gliadina y cómo afecta el tratamiento con ciertas sustancias antioxidantes, realizamos un análisis de una serie de parámetros. En células U937 demostramos el efecto que desencadena el péptido 33-mer y gliadina en la actividad proliferativa y producción citoquinas, mientras que el péptido 19-mer afectó en la producción de especies reactivas del oxígeno y desorganización de la membrana, viéndose paliados estos efectos más destacablemente por el pre-tratamiento con glutatión reducido (GSH), siendo los efectos de las demás sustancias dependientes de concentración administrada. En células Caco-2 evidenciamos el efecto citotóxico de 19-mer y gliadina en la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) y en la actividad del ciclo celular, además de comprobar cómo este tipo celular es mucho más sensible a la concentración de sustancias administradas en los pre-tratamientos, volviendo a las células más sensibles a los péptidos.

Palabras clave: Enfermedad celíaca, gliadina, péptidos, inflamación, proliferación, estrés celular, interleucinas, sensibilidad al gluten.

2. ABSTRACT

Celiac disease is an autoimmune disorder that can occur in genetically predisposed people where the ingestion of gluten leads to damage in the small intestine. Gliadin, considered protein fraction of the gluten has a dual effect on the cells; first, toxic peptides induce an innate immune response characterized by the production of IL-15 by enterocytes, helping to maintain the innate response and, secondly, the immunogenic peptides, which contain epitopes that induce adaptive response by stimulation of T cell clones. In order to investigate the *in vitro* effect of the synthetic peptides, 33-mer and 19-mer and gliadin peptides, and how certain antioxidants affects as treatment, we did a series of analyzes of different parameters. In U937 cells we demonstrated the effect that triggers 33-mer and gliadin peptide in proliferative activity and cytokine production, while the 19-mer peptide affected the production of reactive oxygen species and membrane disorder, seeing these

effects more remarkably alleviated by pre treatment with reduced glutathione (GSH); the effects of other substances administered are concentration dependent. In Caco-2 we show the cytotoxic effect of 19-mer and gliadin in production of reactive oxygen species (ROS) and cell cycle activity, besides checking how this cell type is sensitive to administered substances concentration, becoming cells most sensitive to peptides.

Keywords: Celiac disease, gliadin peptides, inflammation, proliferation, cellular stress, interleukin, gluten sensitivity.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES DE BASE INMUNE

El epitelio intestinal es un sistema complejo con una amplia gama de funciones, incluyendo la digestión, transporte de nutrientes, agua e intercambio de electrolitos además de la función endocrina y la producción de hormonas paracrinas (Sansonetti, 2004). Este epitelio establece una barrera física que separa el medio ambiente luminal del medio interno y previene la penetración de compuestos tóxicos y microorganismos patógenos. Este epitelio desempeña un papel central en la modulación inmune del intestino, actuando como una barrera inmune física, innata y adaptativa contra antígenos extraños. El deterioro de la barrera epitelial se ha asociado con una mayor predisposición a la inflamación intestinal y con un número de enfermedades gastrointestinales (Groschwitz y Hogan, 2009).

Los alimentos ingeridos en la dieta pueden causar inflamación de los tejidos a través de diferentes mecanismos. En el intestino y, particularmente, en los enterocitos, células intestinales encargadas de la absorción de sustancias, los nutrientes son moduladores de diversas funciones celulares y pueden estar implicados en la respuesta inmune y la inflamación del tejido (Veldhoen y Brucklacher-Waldert, 2012).

Los defectos estructurales y funcionales asociados al intestino delgado, derivados de las enteropatías son los causantes de una gran variedad de enfermedades entre la que se encuentra la enteropatía sensible al gluten de la que deriva la enfermedad celíaca (EC).

3.2. ENFERMEDAD CELÍACA

La ESPGHN (Sociedad Europea de Gastroenterología Pediátrica, Hepatología y Nutrición) en 2012 propuso que la enfermedad celíaca podría definirse como una enfermedad sistémica mediada inmunológicamente e inducida por el gluten, una proteína presente en el trigo (gliadina), centeno (secalina), cebada (hordeína) y triticale (híbrido del trigo y centeno) (Vivas y Santolaria, 2010), concretamente a las prolaminas y glutenina, un

grupo de proteínas vegetales que se encuentran en los cereales que afectan a individuos genéticamente susceptibles. La EC se caracteriza por ser una combinación variable de manifestaciones dependientes del gluten, anticuerpos específicos de la EC y haplotipos HLA-DQ2 o HLA-DQ8, causando una inflamación crónica duodenal (Husby *et al.*, 2012).

Así pues, la enfermedad celíaca es una enteropatía sensible al gluten (ESG) de base inmunológica, debida a una intolerancia permanente al gluten que ocasiona la inflamación crónica del intestino delgado en individuos genéticamente predispuestos, caracterizada por una interacción compleja entre factores ambientales y genéticos (Van Heel y West, 2006). La ingesta oral de gluten puede entonces dar lugar a una iniciación de la respuesta inmune innata y adaptativa que resultan en un daño celular y atrofia de las vellosidades en el intestino delgado con la subsiguiente malabsorción (Zimmermann *et al.*, 2014).

La presentación clínica de la enfermedad celíaca es extremadamente heterogénea y varía enormemente con la edad de los pacientes, la duración, la intensidad de la enfermedad y la posible presencia de trastornos extraintestinales (Esteve *et al.*, 2006). Además del gluten como factor ambiental, se requiere una predisposición genética a desarrollar la enfermedad celíaca. La gran mayoría de los pacientes celíacos expresan el antígeno leucocitario humano (HLA) HLA-DQ2 y / o HLA-DQ8 por el cual los péptidos inmunogénicos de la gliadina derivados del gluten son presentados y de ese modo inducen la proliferación de células T sensibles al gluten.

La enfermedad celíaca está mediada por las células T, en la que los péptidos derivados de la gliadina activan la infiltración de éstos en la lámina propia (Cianci *et al.*, 2012). Estos linfocitos representan a las células fundamentales que orquestan el daño tisular en esta enfermedad. Las células T reactivas al gluten procedentes de las lesiones reconocen predominantemente péptidos cuyos residuos de glutamina, que se encuentran en ciertas posiciones, se han convertido a ácido glutámico por desaminación mediada por la transglutaminasa tisular (TG2) (Sollid, 2002), la cual juega un papel muy importante en la patogénesis de la enfermedad celíaca al tratarse de una enzima dependiente de calcio que modifica los enlaces entrecruzados de las proteínas por una reacción de dos etapas: catalizando la formación de un enlace covalente entre los grupos carboxiamido de ciertas glutaminas unidas a proteínas y los grupos ϵ -amino de lisinas de la misma o diferente cadena (Folk y Finlayson, 1977). TG2 es secretada en la lámina propia, generando péptidos de la gliadina a partir del gluten. Tales péptidos se encuentran cargados negativamente, son altamente específicos y se unen con alta afinidad a las moléculas HLA-DQ2 u DQ8, asociadas a la celiaquía. Esto conduce a la liberación de citoquinas proinflamatorias, tales como IFN- γ e IL-15 (Pagliari *et al.*, 2013) que son responsables de la activación de la

actividad citotóxica de los linfocitos intraepiteliales, lo que conduce a una profunda remodelación del tejido (Meresse *et al.*, 2009).

La gliadina, considerada como la fracción proteica del gluten, se encuentra principalmente en el trigo, el centeno y la cebada. Es una proteína peculiar muy rica en glutamina y prolina. Varios péptidos de la gliadina son reconocidos por las células T del intestino y pueden inducir una respuesta inmune adaptativa, pero la mayoría de ellos son digeridos por las proteasas gástricas, pancreáticas y, posteriormente, se hidrolizan por peptidasas localizadas en la membrana del borde en cepillo de los enterocitos (Silk *et al.*, 1985). Además, los antígenos pueden ser degradados en la vía endocítica de los enterocitos (Van de Wal *et al.*, 1998). Sólo dos péptidos principales permanecen sin digerir (Nanayakkara *et al.*, 2013): el 33-mer y el 25-mer. En consecuencia, estos dos péptidos son los principales péptidos que son activos *in vivo* en el intestino después de la ingestión de gluten.

Las fracciones de prolamina en los cereales son el estímulo ambiental responsable del desarrollo del daño intestinal asociada a la EC (Wieser y Koehler, 2008). La presentación clásica de la EC es como un trastorno pediátrico que se caracteriza por pequeñas atrofas de las vellosidades e hiperplasia de las criptas de Lieberkühn (Koning *et al.*, 2005). Sin embargo, especialmente en los pacientes adultos, la arquitectura de la mucosa del intestino es caracterizada por una densa infiltración linfocítica, sin tener que presentar necesariamente atrofia de las vellosidades o hiperplasia de las criptas.

En resumen, el gluten tiene un efecto dual sobre la mucosa del intestino delgado. Por un lado, los péptidos tóxicos, como el 19-mer o pequeñas fracciones dentro de este péptido como el p31-43, aun no siendo reconocidos por los linfocitos T, inducen una respuesta inmunológica innata no específica, que se caracteriza por la presencia de IL-15 producida por los enterocitos. Esta interleucina promueve la producción estrés oxidativo y ayudando a mantener la respuesta innata (Lauret y Rodrigo, 2013). Por otro lado, la respuesta adaptativa se lleva a cabo por el aumento de la permeabilidad, lo que permite que los péptidos inmunológicos tales como 33-mer llegar a la lámina propia en donde se desaminan por la TG2. IL-15 activa a las células dendríticas para presentar los péptidos del gluten deamidados por las moléculas HLA-DQ2 / DQ8 a los linfocitos T CD8 +. Estos hechos comienzan una respuesta Th1, liberando IFN- γ y otras metaloproteasas. Este perfil de citoquinas es el responsable de la lesión epitelial, caracterizada por la presencia de linfocitos intraepiteliales, hiperplasia de las criptas, atrofia de las vellosidades e infiltrado inflamatorio crónico en la lámina propia. (Lauret y Rodrigo, 2013).

3.2.1. EFECTOS INMUNOMODULADORES DE LOS PÉPTIDOS DEL GLUTEN

Los péptidos inmunogénicos tales como P57-68, P57-89 y P63-76 causan una respuesta adaptativa que procede de su unión a HLA-DQ2 o -DQ8 de células presentadoras de antígeno y la posterior estimulación de las células T (Auricchio *et al.*, 2004). La presencia repetitiva de estos residuos los convierte en el sustrato preferido de la enzima transglutaminasa tisular (tTG), cuya principal función es catalizar el entrecruzamiento covalente e irreversible de un residuo de glutamina en proteínas glutamina-donantes con un residuo de lisina en las proteínas glutamina-aceptoras, lo que resulta en la formación de complejos peptídicos DQ-gluten (Folk, 1983). Sin embargo, aparte del entrecruzamiento de sus sustratos, tTG también puede hidrolizar péptidos unidos a la glutamina a ácido glutámico a un pH bajo o cuando no hay proteínas aceptoras disponibles, un proceso que conduce a una mayor inmunogenicidad de péptidos de gluten (Wieser y Koehler, 2008). Los complejos peptídicos DQ-gluten activan DQ2 o DQ8 restringidos a células T que proliferan y producen principalmente citocinas de tipo Th1, particularmente interferón-gamma (IFN- γ) (Ferretti *et al.*, 2012). La secreción de citoquinas Th1 activa la liberación de enzimas tales como metaloproteinasas de la matriz que pueden dañar la mucosa intestinal, con una pérdida de la estructura de las vellosidades (Kagnoff, 2005). Citoquinas Th1 aumentan la permeabilidad epitelial que, a su vez, aumentan el paso de péptidos del gluten y la unión peptídica a moléculas DQ2 y DQ8 sobre las células presentadoras de antígeno, dando lugar a una retroalimentación crónica del proceso inflamatorio, siempre y cuando los péptidos del gluten estén presentes en el lumen intestinal (Ferretti *et al.*, 2012). Las interacciones entre los péptidos tóxicos del gluten y células específicas en la lámina propia, tales como células epiteliales, macrófagos y células dendríticas inducen una respuesta inmune innata por una desregulación que produce un aumento de la expresión de diferentes mediadores tales como la interleucina 15 (IL-15) con un posterior aumento masivo de linfocitos intraepiteliales (Maiuri *et al.*, 2003). Estos eventos contribuyen al daño de la matriz de la mucosa (Pender *et al.*, 1996). En particular IL-15, un importante mediador de la respuesta inmune innata está implicado en la proliferación de los enterocitos de las criptas de Lieberkühn, una alteración precoz por EC que en la mucosa causa hiperplasia en las criptas.

Los péptidos del gluten ganan el acceso a las placas de Peyer de la mucosa del intestino a través de las células M o por alteración de la permeabilidad del epitelio donde allí son procesadas por las células dendríticas (Kelsall y León, 2005), células B o enterocitos (que expresen HLA de clase II) y presentadas a las células T CD4⁺. Estas células se recircularían a la lamina propia (Shibahara *et al.*, 2001) donde, con el contacto de los péptidos del gluten, se induciría su activación y proliferación, con la producción de citoquinas pro-inflamatorias que, junto a la producción de metaloproteasas (Satsangi *et al.*, 2001) y

factor de crecimiento de los queratinocitos (KGF) (Salvati *et al.*, 2001) por parte de las células del estroma, inducirían hiperplasia de las criptas (Maiuri *et al.*, 2000). La siguiente fase es la atrofia de las vellosidades, inducida por la muerte de los enterocitos por los linfocitos intraepiteliales (Di Sabatino *et al.*, 2001)

3.2.2. CITOTOXICIDAD DEL GLUTEN NO MEDIADA POR EL SISTEMA INMUNE

3.2.2.1 EFECTOS DEL GLUTEN EN EL ESTRÉS OXIDATIVO

Las especies reactivas del oxígeno (ERO) se originan por un desapareamiento de electrones, lo que otorga una naturaleza altamente inestable y oxidante a dichas especies y que, cuando se encuentran presentes en exceso, pueden causar daño oxidativo de macromoléculas tales como lípidos, proteínas y ADN (Stohs, 1995)

Algunos péptidos de la α -gliadina, poseen la capacidad de penetrar en las células, de modo que son internalizados por captación endocítica (Heyman y Menard, 2008). La acumulación de péptidos en los lisosomas conduce a la activación de algunas vías de transducción de señales y al aumento de los niveles de radicales libres (especies reactivas del oxígeno, ERO y especies reactivas de nitrógeno, RNS) (Zimmer *et al.*, 2010). Se ha supuesto que el estrés oxidativo es uno de los mecanismos que pueden desempeñar un papel importante en la toxicidad de la gliadina.

Por contrapartida, el glutatión (L-g-glutamyl-L-cisteinilglycine) es un tripéptido no proteínico ubicuamente distribuido por las células. Este juega un papel muy importante en los mecanismos de defensa intracelular contra el estrés oxidativo y en la iniciación y el mantenimiento de las respuestas inmunes dependientes de células T. La enzima glutatión peroxidasa (GPx) usa GSH (glutatión reducido) para reducir el H_2O_2 a H_2O y los lipoperóxidos (LOOH) a alcoholes del alquilo. Como resultado se obtiene glutatión oxidado (GSSG) que, posteriormente es reducido a GSH por la enzima glutatión reductasa (GR) usando NADPH como co-factor (Gadea *et al.*, 2013). Así pues el glutatión es un antioxidante, antitoxina y enzima-cofactor de gran alcance. A menudo alcanza concentraciones milimolares en la célula, lo que hace que sea uno de los antioxidantes intracelulares más importantes (Masella *et al.*, 2005). El glutatión está en su mayoría presente en las células en una forma reducida (GSH). En una célula sana, glutatión oxidado (GSSG) rara vez supera el 10% del conjunto total de glutatión (Kosower y Kosower 1978) y la disminución de la relación GSH / GSSG es una buena indicación de estrés oxidativo (Hwang *et al.*, 1992). Las GSH S-transferasas (GST) lo utilizan como un cofactor en la desintoxicación de varias toxinas endógenas y exógenas.

El estado redox intracelular regula varios aspectos de las funciones celulares. El ciclo redox del GSH es un mecanismo protector importante contra el daño de la membrana celular por peroxidación lipídica (Aw, 2005), una reacción en cadena en la que los ácidos grasos poliinsaturados de los lípidos de membrana se encuentran oxidados por las ERO (Spiteller, 2007). Además de ser un cofactor para la GPx, GSH puede reaccionar directamente con los radicales libres y tiene un papel importante en la regeneración de formas activas de otros antioxidantes debido a su potencial de reducción (Stojiljković *et al.*, 2012)

Utilizando diferentes modelos celulares, se ha informado de que la exposición a la gliadina refleja un desequilibrio oxidativo intracelular, que se caracteriza por un aumento en los niveles de productos de peroxidación de lípidos, un aumento en el balance glutatión oxidado (GSSG) / reducido (GSH) y una disminución de grupos sulfhidrilo unidos a proteínas (Luciani *et al.*, 2010). También se detectaron perturbaciones estructurales importantes de la membrana plasmática celular (Schumann *et al.*, 2008). El incremento del daño oxidativo podría inducir alteraciones de la morfología de las células (Elli *et al.*, 2003), la proliferación celular, la apoptosis (Di Sabatino *et al.*, 2001) y la viabilidad celular (Giovannini *et al.*, 2000).

La relación entre enfermedad celíaca y daño oxidativo se apoya en varios estudios sobre las células intestinales y células circulantes. El aumento de los niveles de prostaglandina E2 (PGE2) se demostró en homogeneizados pequeñas muestras de biopsia de intestino de pacientes con enfermedad celíaca activa (Giovannini *et al.*, 1994) mientras que los niveles de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa y reductasa se redujeron en biopsias de pacientes con enfermedad celíaca con la consiguiente disminución de los niveles de GSH (Stojiljković *et al.*, 2009). Varias investigaciones informaron de que especies reactivas de nitrógeno tales como óxido nítrico (NO) también juegan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad celíaca con unos niveles de NO elevados. iNOS se expresa constitutivamente en enterocitos duodenales humanos; su actividad se incrementa en pacientes con enfermedad celíaca no tratada (Daniels *et al.*, 2005) y se corrige parcialmente cuando los pacientes son tratados con la dieta libre de gluten (Beckett *et al.*, 1998). Los altos niveles de NO están presentes en el suero (Ertekin *et al.*, 2005) y la orina (Högberg *et al.*, 2011) de los niños con enfermedad celíaca y se correlacionan con un aumento de la expresión de iNOS en el intestino delgado.

Un aumento de los marcadores de daño oxidativo de los lípidos (ácido tiobarbitúrico reactivo y hidroperóxidos lipídicos), proteínas (grupos carbonilo) y el ADN se demostró en las células intestinales y fluidos biológicos (Szaflarska-Poplawska *et al.*, 2010) de pacientes con EC con respecto a los controles. Se observaron también cambios en la vitamina E y en

las actividades enzimáticas antioxidantes en las células circulantes y el plasma de los pacientes (Hozyasz *et al.*, 2003). La disminución del ARNm y de las enzimas antiinflamatorias PON1 y PON3 fue informado por Radem *et al.* en biopsias intestinales de pacientes celíacos (Rothem *et al.*, 2007). Las defensas antioxidantes disminuidas pueden comprometer la mucosa intestinal inflamada, haciéndola más susceptible a daño tisular oxidativo, lo que dificulta la recuperación de la mucosa y el retorno de la integridad de las células epiteliales.

3.2.3. FACTOR NUTRICIONAL EN LA ENFERMEDAD CELÍACA

Varios componentes de la dieta tienen el potencial de modular la predisposición a enfermedades inflamatorias crónicas intestinales y pueden tener un papel en la terapia nutricional de la enfermedad celíaca (Calder, 2011). Estos componentes actúan a través de una variedad de mecanismos incluyendo la disminución de la producción de mediadores inflamatorios a través de efectos sobre la señalización celular y la expresión génica, la reducción de la producción de oxidantes dañinos, la promoción de la función de la barrera intestinal y las respuestas antiinflamatorias.

3.2.3.1. ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos pueden influir en la inflamación a través de una variedad de mecanismos, incluyendo actuando a través de receptores / sensores que controlan la señalización inflamatoria celular y patrones de expresión génica de la superficie celular e intracelular. Los eicosanoides producidos a partir de ácidos grasos (n=6) tales como ácido araquidónico (AA) tienen un papel pro-inflamatorio. Por el contrario, los ácidos grasos (n-3) tales como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) da lugar a eicosanoides con propiedades anti-inflamatorias (Calder, 2011).

Los ácidos grasos poliinsaturados y sus derivados son ligandos endógenos para PPAR- γ y se ha demostrado que la inducción por ácidos grasos poliinsaturados de PPAR- γ se asocia con una reducción en la producción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α y IL-6) (Zapata-González *et al.*, 2008).

En cuanto a la enfermedad celíaca, se ha demostrado que la fosfolipasa citosólica A2 (cPLA₂) mediadora para la liberación de ácido araquidónico (AA), a partir de los linfocitos intra-epiteliales, tras la incubación con gliadina, contribuye a la citólisis de los linfocitos y a la respuesta inmune de la enfermedad celíaca. Por otra parte, utilizando una línea humana intestinal de células epiteliales (Caco-2) expuesta a péptidos de la gliadina, se sabe que el ácido docosahexaenoico (DHA), un ácido graso poliinsaturado de la serie omega-3, es

capaz de contrarrestar muchos de los efectos proinflamatorios del AA. De hecho, DHA impide el incremento de la actividad de cPLA₂ en Caco-2 expuesta a los péptidos de la gliadina y consecuentemente reduce la liberación de AA (Vincentini *et al.*, 2011).

Estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales han demostrado que la ingestión de ácidos grasos poliinsaturados (n-3) especialmente el ácido eicosapentaenoico (EPA) y (DHA) ejercen efectos beneficiosos en varios trastornos autoinmunes y inflamatorios (Calder, 2004), modulando la citotoxicidad y asegurando una recuperación de la atrofia de la mucosa en la EC. Aunque sus efectos beneficiosos ya no pueden ponerse en duda, sus mecanismos de acción moleculares son complejos e implican una serie de vías de señalización integradas. Ha sido demostrado que los ácidos grasos poliinsaturados n-3 influyen en microdominios lipídicos tales como balsas de lípidos, caveolas (Ma *et al.*, 2004) y en la modulación de la expresión génica (Nakamura *et al.*, 2004).

4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Los abundantes estudios de base clínica para el diagnóstico y la terapia de la enfermedad celíaca y la escasa información actualizada existente sobre los efectos celulares e inmunitarios *in vitro* que tanto la gliadina como ciertos péptidos de ésta ejercen sobre determinadas poblaciones celulares, así como la respuesta a la suplementación de ciertas sustancias (antioxidantes, ácidos grasos poliinsaturados etc...), surgió este estudio que, usando diferentes modelos celulares como son Caco-2 y U937 para emular la respuesta celular e inmunológica *in vitro*, permitieron la obtención de un mayor conocimiento de los mecanismos celulares y e inmunitarios de la enfermedad.

Una cuestión sin resolver es cómo algunos péptidos tóxicos e inmunológicamente activos derivados del gluten responden al tratamiento con determinadas sustancias antioxidantes. Con el objetivo de investigar el efecto de dos grandes péptidos sintéticos, 33-mer y 19-mer, así como el conjunto de péptidos de la gliadina sobre células en cultivo *in vitro* para tratar de entender el papel de estos en la patogénesis de la enfermedad celíaca y como afecta la aplicación de determinadas sustancias supletorias, realizamos una serie de tratamientos previos al de los péptidos para comprobar cómo afectan estos a la actividad proliferativa, producción de factores inflamatorios, producción de especies reactivas del oxígeno y desorganización de la membrana y en qué efectos derican esas sustancias añadidas previamente sobre éstos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MODELOS CELULARES

En la actualidad, basándose en la existencia de una buena correlación entre la absorción *in vitro* de las células Caco-2 y la absorción intestinal *in vivo* (Liu *et al.*, 2004), Caco-2 ha sido un modelo celular ampliamente utilizado como una eficaz herramienta *in vitro* para predecir la absorción intestinal humana de medicamentos orales. Las células Caco-2 derivan de células de adenocarcinoma de colon humano y además poseen morfología, enzimas marcadoras, microvellosidades, uniones estrechas y permeabilidad similares a las de las células epiteliales intestinales.

Los monocitos y los macrófagos juegan un papel esencial en la inmunidad innata. La línea celular U937 es una línea celular humana establecida a partir de un linfoma histiocítico difuso y que muestra muchas características monocíticas. Sirve como modelo *in vitro* para la diferenciación de los monocitos / macrófagos, pruebas antitumorales, de tumorigenicidad, inflamación, producción de citoquinas, modelo de apoptosis etc...

Todas las experiencias con células que se llevaron a cabo en este trabajo de fin de máster recibieron el visto bueno del comité de bioética con referencia de CEIOMGAB-180714-1.

5.2. CULTIVOS CELULARES

Células de linfoma histiocítico difuso, U937, células que se encuentran en suspensión en el medio de cultivo (Imagen 1-A), fueron mantenidas en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) con la suplementación de un 1% de penicilina/estreptomina, realizando cambios de medio cada 48-72 horas tras observar agotamiento del mismo. Las células fueron cultivadas en frascos de cultivo Falcon de 75 cm² y mantenidas en estufa a 37°C, con 5 % de CO₂ y a 0% de O₂. Las poblaciones se fueron renovando y separando en frascos conforme se observaba saturación de los mismos para obtener una cantidad de células para las diferentes experiencias lo suficientemente grande.

Células de adenocarcinoma de colon, Caco-2, células adherentes que necesitan crear una monocapa y presentar confluencia para crecer (Imagen 1-B), fueron mantenidas en Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM 1x, Gibco) suplementado con un 1% de penicilina/streptomina. Las células fueron cultivadas en frascos de cultivos Falcon de 75 cm² y mantenidas en estufa a 37°C, con 5 % de CO₂ y a 0% de O₂ siendo rutinariamente renovadas las poblaciones de células dos veces por semana para evitar la saturación del frasco mediante el levantamiento de las mismas con una solución que contiene tripsina-

EDTA (Sigma-Aldrich), aumentando así en número de frascos disponibles y la población. El medio de los frascos fue removido por decantación y renovado cada 48h hasta observar un porcentaje alto de confluencia (al menos del 80% o mayor) para realizar el levantamiento y pase.

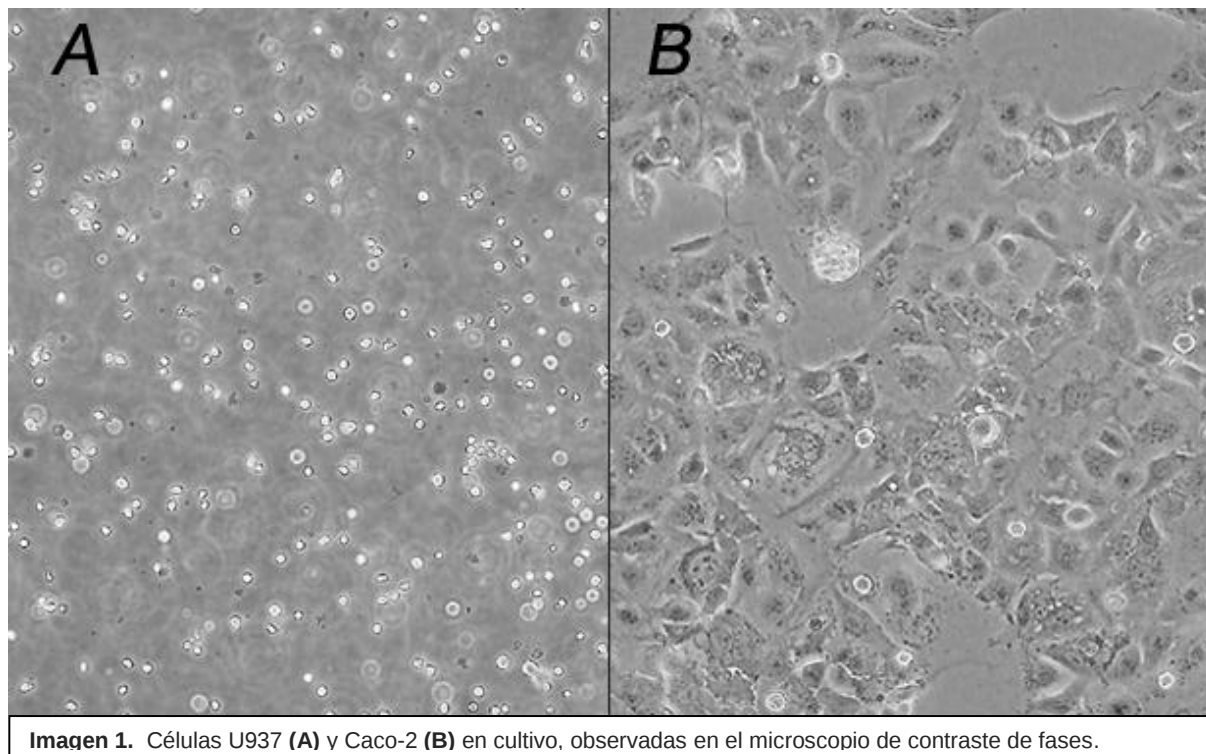


Imagen 1. Células U937 (A) y Caco-2 (B) en cultivo, observadas en el microscopio de contraste de fases.

5.3. PÉPTIDOS Y DIGESTIÓN DE LA GLIADINA

Los siguientes péptidos de la gliadina: LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF (correspondiente a la α 2-gliadina; región p56-88; 33-mer) y LGQQQPFPPQQPYPQPQPF (correspondiente a la α -gliadina; región p 31-49; 19-mer) fueron sintetizados por la empresa Biomedal, obteniéndolos en formato liofilizado, teniendo que ser reconstituidos previamente para su posterior uso en los tratamientos.

Para la preparación del conjunto de los péptidos de la gliadina, la muestra fue disuelta en 50mL de HCl (pH: 2.0) a la que se le añadieron 100 mg de pepsina (Sigma-Aldrich). La mezcla se homogeneizó por agitación magnética a 37°C y, tras dos horas, fue centrifugada durante 20 minutos a 20°C y a 6000 g. El pH del sobrenadante fue ajustado a 7.8 con la adicción de 0.1 mol/l de NaOH y 1 mL de tripsina (Sigma-Aldrich). Después de las dos horas de incubación a 37°C bajo agitación magnética, el pH fue ajustado a 7 con 0.1 mol/l de HCl y la digestión fue centrifugada durante 20 min a 6000 g. El resultante fue entonces alicuotado y congelado a - 20 °C hasta su uso.

5.4. PRE-TRATAMIENTOS

Las células Caco-2 y U937, estando en sus condiciones óptimas para ser manipuladas, antes de ser tratadas con los péptidos, serían previamente pre-tratadas con una serie de sustancias antioxidantes.

5.4.1. GLUTATIÓN

Previamente al tratamiento con los péptidos, para aumentar los niveles intracelulares de GSH y GSSG, las células se incubaron, cada pre-tratamiento por separado, con 50µl de una solución 5Mm de GSH y GSSG durante 6 horas. Se sabe que el FBS (suero fetal bovino) influye en los niveles celulares de GSH, así pues se decidió cultivar las células en ausencia de éste para evitar interferencias en los resultados.

Para la preparación tanto de GSH (Sigma-Aldrich) como GSSG (Sigma-Aldrich) se dispuso de 10ml del medio correspondiente al tipo celular al que le realizáramos el tratamiento, a los cuales se les añadiría 0.03 g de GSH y a otros 10ml 0.02 g de GSSG.

5.4.2. ÁCIDO DOCOSAEXANOICO

Para aumentar los niveles intracelulares de este ácido graso poliinsaturado en los grupos de cultivos que llevasen este tipo de pre-tratamiento, durante las 6 horas previas al tratamiento con los péptidos, se incubaron con una solución 0.2 M de un preparado de DHA. El preparado se obtuvo que disolviendo una cápsula de 795 mg de ácido docosahexaenoico (DHA) (Eukid, Ferring Pharmaceuticals) en 0.01% (50µl) de etanol absoluto al que se le añadió un volumen de 10 mL del medio que procediese (RPMI o DMEM). Conjuntamente con la incubación con los antioxidantes previo tratamiento con los péptidos, también se añadió el ácido Docosahexaenoico a los grupos de células que les correspondiese, tendiendo entonces 3 grupos de pre-tratamientos (GSH, GSSG y DHA) incluyéndose sus respectivos controles sin el tratamiento posterior de los péptidos.

Cada grupo de células, como se especificará mas adelante, recibirá un solo pre-tratamiento con cada sustancia, en ningún momento habrá un grupo con estas tres sustancias simultáneamente.

5.5. TRATAMIENTOS

Los correspondientes tratamientos con péptidos fueron aplicados en los dos tipos celulares U937 y Caco-2. Las diferentes condiciones a las que se expusieron dichas células fueron al tratamiento con el péptidos 33-mer, 19-mer y a todos los péptidos de la gliadina,

incubándose con cada uno de estos durante 24 horas tal y como se concretará más adelante.

5.6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

De cara a la experimentación, se establecieron los siguientes grupos sobre los que se realizarían los pre-tratamientos y tratamientos (Tabla 1) : i)Control, sólo células y el medio que corresponda, ii)GSH, iii)GSSG, iv)DHA; células que sólo recibirían el pre-tratamiento con las sustancias antioxidantes sin esperar un posterior tratamiento con péptidos, v)33-mer, vi) 19-mer, vii) Gliadina; células tratadas únicamente con los péptidos, viii) GSH + 33-mer, ix) GSSG + 33-mer, x) DHA + 33-mer; células que, tras el pre-tratamiento con los antioxidantes, recibirían el tratamiento con el péptido 33-mer, xi) GSH + 19-mer, xi) GSSG + 19-mer, xii) DHA + 19-mer; igual que lo mencionado anteriormente pero con el péptido 19-mer, xiii) GSH + Gliadina, xiv) GSSG + Gliadina, xv) DHA + Gliadina; lo mismo que con los péptidos anteriores.

		Sin tratamiento	Tratamiento		
Sin pre-tratamiento		Control	33-mer	19-mer	Gliadina
	GSH	GHS	GSH + 33-mer	GSH + 19-mer	GSH + Gliadina
Pre-tratamiento	GSSG	GSSG	GSSG+ 33-mer	GSSG + 19-mer	GSSG + Gliadina
	DHA	DHA	DHA + 33-mer	DHA + 19-mer	DHA + Gliadina

Tabla 1. Resumen de los diferentes grupos de tratamientos de cada una de las sustancias administradas a las células. La columna 'Sin tratamiento' incluye muestras de células que solo fueron incubadas con las sustancias antioxidantes (50µL·5Mm) y el ácido graso ((50µL·0.2M) y el control que incluía sólo las células en el medio de cultivo pertinente (RPMI o DMEM). Los Tratamientos fueron los dos péptidos sintéticos 33 y 19-mer junto a los péptidos degradados de la gliadina. Los pre-tratamientos fueron a base de las dos formas activas del glutatión, reducida (GSH) y oxidada (GSSG) y un ácido graso poliinsaturado de la serie ω-3 (DHA).

Para dichas experiencias, previamente las células U937, habiendo obtenido una densidad celular de 1×10^6 células/mL fueron traspasadas de los frascos de cultivo a un tubo Falcon de 30 mL donde se sometieron a centrifugación durante 10 min a 1200 rpm a una temperatura constante de 24°C. Tras la centrifugación se procedió a la siembra de 200 µl de células por pocillo a cada uno de los pocillos de una placa de cultivo, con la final adicción de 800 µl de medio a cada uno de los pocillos para mantener las células el tiempo que durase las incubaciones correspondientes.

Las células Caco-2, habiendo conseguido una densidad celular de 1×10^6 células/mL fueron levantadas de sus frascos de cultivo usando una solución de tripsina EDTA 5 ·4 mM ,previo lavado en PBS, durante 3-5 min a 37 ° C y traspasadas a un tubo Falcon de 30mL donde, tras centrifugar durante 10 min a 1200 rpm, se retiró gran parte de sobrenadante para eliminar los restos de la tripsina, tóxica para las células, concentrando así las células, desde donde se pasarían 200 µl de células a cada uno de los pocillos de una placa de

cultivo, con la final adición de 800 µl de medio DMEM, precisando de que presentaran adherencia y confluencia en éstos para iniciar las incubaciones.

Así pues, cada tipo celular recibiría los correspondientes tratamientos de forma independiente, permitiendo así el poder observar los cambios que las células manifestasen y a causa de qué lo hacían de cara a las determinaciones que se les hicieran.

Una vez cultivadas en los pocillos de las placas y, tras su incubación con los antioxidantes 6 horas, 50 µl de cada péptido (33-mer, 19-mer y el conjunto de todos los péptidos de la gliadina) en una concentración de 50ug/ml fueron añadidos a su pocillo correspondiente, dejándolo incubar durante 24 horas a 37°C. Posteriormente, se les realizarían una serie de determinaciones para comprobar cómo había influido el tratamiento con péptidos y de que forma el pre-tratamiento con antioxidantes había intervenido.

Este procedimiento experimental sería usado únicamente para una determinación cada vez, así pues se repetiría tantas veces como determinaciones diferentes se hiciesen en el tipo celular que se aplicase, exceptuando en el caso de la proliferación celular e IFN-γ en las células U937, donde de una misma placa o procedimiento experimental se separarían células y sobrenadante para cada una de las determinaciones, comentadas a continuación.

5.7. DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

La proliferación celular es el aumento del número de células como resultado del crecimiento celular y la división. La evaluación precisa del número de células y la proliferación celular es útil en muchos ensayos y es una lectura clave en aplicaciones de citotoxicidad y apoptosis. La proliferación celular también es un indicador muy sensible de estrés celular, ya que requiere estructuras y funciones celulares intactas.

Para detectar la mayor o menor proliferación celular se utilizó BrdU (Bromodesoxiuridina, BrdU Cell Proliferation Assay, Chemicon International, USA) un análogo de la timidina que se incorpora en el ADN, siendo revelada su presencia mediante un método enzimático, usando peroxidasa (anticuerpo primario Anti-BrdU + anticuerpo secundario unido a peroxidasa).

Las células U937 se recogerían de los pocillos en eppendorfs y, por centrifugación a 1200 rpm durante 10 min se separaría el sobrenadante (que se usará más adelante) del pilled de células a las que se les determinaría actividad proliferativa usando un método colorimétrico, el de la bromodesoxiuridina (BrdU, 5-Bromo-2'-Deoxyuridina), que mide la síntesis de ADN mediante la cantidad de BrdU unida a éste, siendo detectada mediante la medición en un espectrofotómetro, a una absorbancia de 450 nm.

5.8. DETERMINACIÓN DE IFN- γ

El interferón gamma es una citoquina producida por linfocitos T CD4+, CD8+, células T, así como por células NK (natural Killer) en respuesta a algún estímulo inmune o inflamatorio, que coordina una serie de respuestas celulares e inmunitarias. El interferón gamma se encarga de orquestar la respuesta de los macrófagos, además también dirige la atracción de leucocitos y el crecimiento, maduración y diferenciación de muchos tipos celulares, también refuerza la actividad de las células NK y regula la función de las células B.

Para determinar la producción de interferón gamma en las células U937 tras los tratamientos, los sobrenadantes que fueron recolectados con anterioridad en la determinación de la proliferación y congelados a -20 hasta su uso, se utilizaron para medir la secreción de la citoquinas IFN- γ mediante un kit ELISA (Thermo scientific, USA) siguiendo sus especificaciones.

Para poder cuantificar la cantidad de IFN- γ que había en las muestras se tuvo que realizar una técnica ELISA previamente, la cual es un inmunoensayo en el que un antígeno (IFN- γ) inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo (anti- IFN- γ) enlazado a una enzima (peroxidasa) capaz de generar un producto detectable en el espectrofotómetro.

5.9. MÉTODO DE MEDICIÓN CON FLUOROCROMOS Y ANÁLISIS POR CITOMETRÍA

La citometría de flujo es una tecnología en la que se miden múltiples parámetros de una célula o partícula en suspensión una vez sido marcada por fluorocromos dentro de una población heterogénea. La técnica citométrica usada en las experiencias que implicaron esta tecnología fue la de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) que es un tipo especializado de citometría de flujo. Esta técnica provee un método para la clasificación y selección de células provenientes de una mezcla de varias poblaciones, según las características particulares de dispersión y fluorescencia de cada célula. El objetivo del análisis por fluorescencia en citometría de flujo es asignar a cada célula un grupo específico de células que compartan propiedades comunes.

5.9.1. DETERMINACIÓN DEL CICLO CELULAR

La respuesta a los tratamientos de las células monocíticas y epiteliales se determinó por su capacidad de proliferación y apoptosis en presencia de las sustancias administradas.

Para el estudio del ciclo celular por citometría de flujo, U937 y Caco-2 tras sus correspondientes tratamientos e incubaciones, fueron recogidas, permeabilizadas y posteriormente, teñidas con Ioduro de Propidio (IP), un agente intercalar impermeable en

células vivas y una molécula fluorescente que se integra en el ADN. El Ioduro de Propidio se usa para evaluar la viabilidad celular o contenido de ADN, usándose para diferenciar las células necróticas, apoptóticas de las normales con el análisis mediante citometría de flujo a una absorbancia de 650nm.

5.9.2. DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO

2'-7' diclorodihidrofluoresceindiacetato (H₂DCFDA) es un fluorocromo indicador de generación de especies reactivas del oxígeno en las células; es un componente no fluorescente, permeable a las células estables que, al ser des-esterificada intracelularmente se convierte en una molécula altamente fluorescente. Una vez oxidado, emite fluorescencia verde, que es colectada por citometría de flujo con una absorbancia de 525nm.

Para el estudio de la producción de especies reactivas del oxígeno por citometría de flujo, ambas líneas celulares fueron recogidas de sus placas a tubos eppendorf e incubadas con H₂DCFDA 0.5μM previamente diluido en el medio correspondiente a las células a las que se le realice el estudio. Así pues 5mg de H₂DCFDA fue diluido en 25ml de medio, recibiendo 50μl por eppendorf, dejándose incubar una hora a 37°C. Posteriormente fue analizado por citometría de flujo a una absorbancia de 525nm.

5.9.3. EVALUACIÓN DEL ESTADO DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

La Merocianina 540 (M540) es una tinción hidrofóbica y lipofílica muy sensible a los cambios en la conformación de la membrana, usada para monitorizar la desorganización lipídica de la membrana celular.

Para detectar incrementos de la desorganización de la membrana plasmática, células U937 que fueron previamente tratadas se recogieron en diferentes eppendorfs donde se les añadiría el fluorocromo, previamente preparado con medio RPMI, de donde cada eppendorf recibirá 6 μl de M540 1mM y se dejaría incubar en oscuridad durante 15 min a 37°C. Posteriormente las muestras fueron analizadas por el citómetro a una absorbancia de 540 nm para ver el grado de fluorescencia que éstas mostraban en función de la desorganización plasmática.

5.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de Interferón gamma fueron analizados utilizando el programa estadístico Statgraphic centurión XVII y el análisis se basó en una comparación de medianas usando la prueba de Kruskal-Wallis. Los datos se consideraron significativos (asterisco) si $P < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

El índice de proliferación celular (IPC) obtenido en cada una de las muestras es el resultado de la cantidad de BrdU incorporado al ADN de las células y, por ende, indicativo de qué muestra estaba siendo más o menos proliferativa en función de la absorbancia registrada. El resultado del análisis de los pocillos en el espectrofotómetro a 450nm tras la técnica nos proporcionó una serie de absorbancias, las cuales usamos para calcular el *Índice de estimulación* o *Índice de proliferación celular*. A mayores absorbancias registradas, mayor cantidad de BrdU incorporado y por tanto la célula está registrando mayor actividad proliferativa e IPC.

Entendiendo eso y que las células U937 pertenecen al sistema inmune, el péptido 33-mer con respecto al 19-mer (Fig. 1-B), resultó mostrar un índice de proliferación mayor, esto es porque el péptido 33-mer es un péptido de naturaleza inmunogénica, un antígeno que desencadena una serie de respuestas adaptativas que desembocan en una respuesta en las células y por lo tanto la proliferación para hacer frente a tales antígenos. Con la gliadina (Fig. 1-B), la cual degradamos para liberar todos sus péptidos, donde están presentes no solo el 33-mer, sino otros muchos que son inmunogénicos como el 25-mer, el índice de proliferación celular es mayor, en respuesta al daño ejercido por los diferentes péptidos presentes en la gliadina.

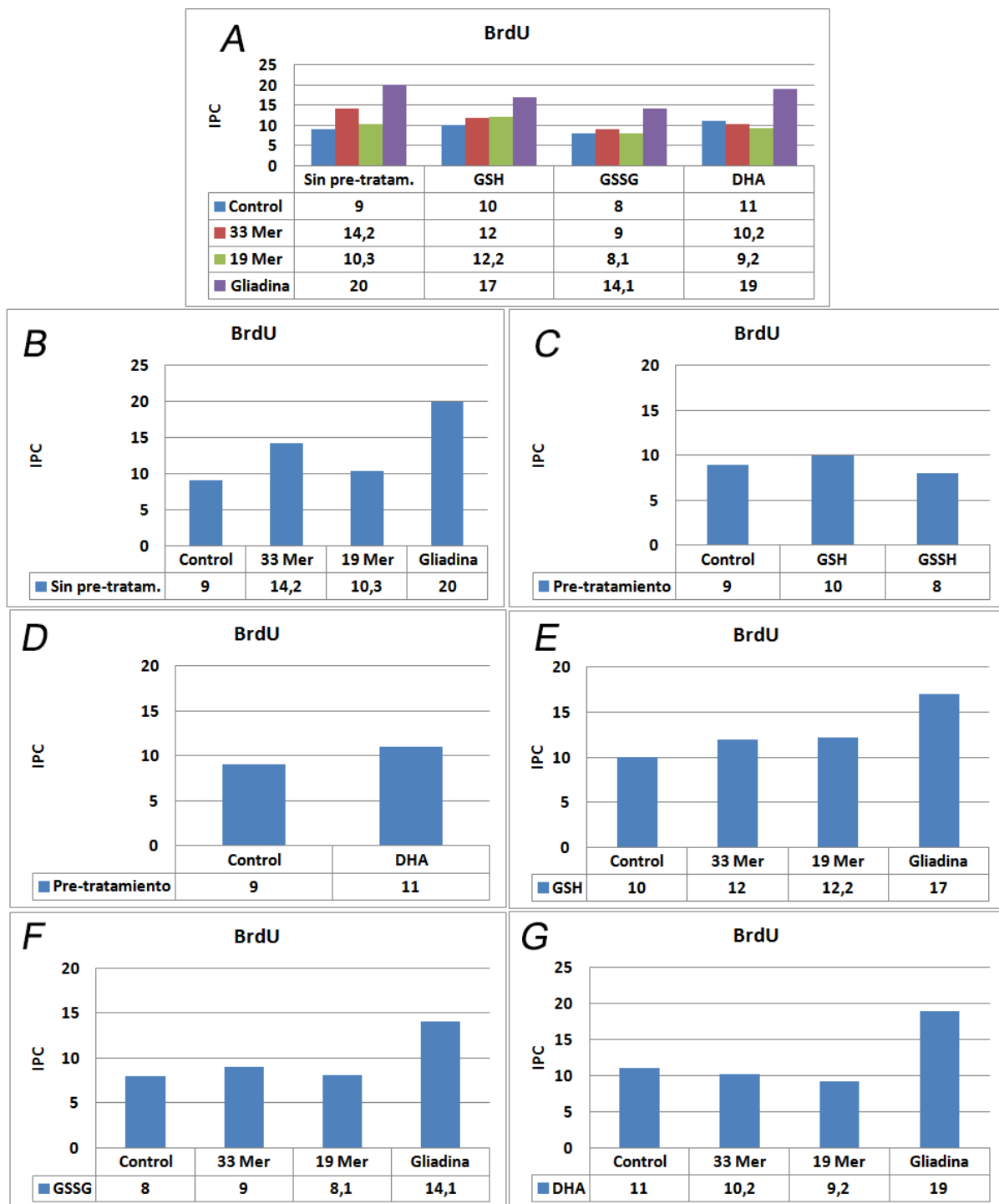


Figura 1. Histogramas que ilustran los datos espectrofotométricos de los grupos de muestras que incorporaron BrdU, medidas a 450nm, traducidos en índice de proliferación celular (IPC). Incubación de muestras con pre-tratamiento 6h antes del tratamiento posterior con péptidos y gliadina, con una duración de 24 h hasta el momento de la medición. **A-** Sumario del IPC de todos los grupos de pre-tratamientos y tratamientos. **B-** IPC de muestras control tratadas con péptidos (50ug/ml). **C-** IPC de muestras control pre-tratadas con antioxidantes (50μL·5Mm). **D-** IPC de la muestra control pre-tratada con ácido docosaexanoico (DHA) (50μL·0.2M). **E-** IPC de las muestras pre-tratadas con glutatión reducido (GSH) y posteriormente tratadas. **F-** IPC de las muestras pre-tratadas con glutatión oxidado (GSSG) y posteriormente tratadas. **G-** IPC de las muestras pre-tratadas con DHA y posteriormente tratadas.

En el grupo de muestras correspondientes a los pre-tratamientos (Fig. 1-C), el IPC aumentó ligeramente en la muestra con GSH, encontrándose incluso indicios de una acción anti-proliferativa en el caso de las células tratadas con GSSG. El pre-tratamiento de las células con el ácido graso docosaexanoico (DHA) (Fig. 1-D) aumenta el IPC por encima de lo que lo hace el GSH.

El grupo de muestras expuestas al pre-tratamiento con las sustancias antioxidantes y el ácido graso con el posterior tratamiento de los péptidos resultó, a efectos proliferativos, en que el GSH disminuye el IPC en las muestras tratadas con 33-mer y Gliadina (Fig. 1-E), que son los que más IPC desencadenaban con respecto a las muestras sin pre-tratamiento (Fig. 1-B) y aumenta en el caso del 19-mer con respecto al control (Fig. 1-E) avisando de una posible sensibilización de las células al péptido. En el caso de las muestras pre-tratadas con GSSG (Fig. 1-F), se produce una mayor disminución del IPC en todos los tratamientos con péptidos con respecto a las muestras con péptidos sin pre-tratamiento (Fig. 1-B) y, por último, el DHA también provocó una disminución en el IPC previa exposición a los péptidos (Fig. 1-E) en comparación con las muestras que no recibieron el pre-tratamiento (Fig. 1-B).

En resumen, en las células U937 (Fig.1-A), la adición del péptido 33-mer y la gliadina inducen una mayor proliferación celular en respuesta a la toxicidad producida por los péptidos. La suplementación con glutatión (GSH y GSSG) y ácido docosaexanoico (DHA) resulta ser beneficiosa para la disminución, mantenimiento y regulación de la proliferación celular tras el daño inducido.

6.2. DETERMINACIÓN DEL INTERFERÓN γ

El interferón γ (IFN γ) se produce en grandes cantidades bajo ciertas circunstancias patológicas, como en el caso de una autoinmunidad. El IFN γ es un medidor de la inmunotoxicidad en la enfermedad celíaca, por lo que, a mayor cantidad (pg/ml) de esta citoquina en el medio celular, mayor toxicidad mediada inmunológicamente.

Tras la incubación a la que se expusieron las muestras con los tratamientos, se realizó la medida de las absorbancias de cada una de las muestras mediante el lector de Elisa o espectrofotómetro, junto con una serie de muestras estandarizadas con las que se realizaría la posterior recta de calibración. Se obtuvieron los pg/mL de IFN- γ correspondientes a las absorbancias de cada una de las muestras a partir de esa recta y la ecuación que esta nos genera.

Las muestras tratadas con péptidos y gliadina manifestaron un aumento en la producción de IFN- γ (pg/mL), siendo destacable en el péptido 33-mer y gliadina (Fig.1-B). En cambio, las muestras que únicamente recibieron el pre-tratamiento con las sustancias

antioxidantes y el ácido graso: el GSH (Fig. 2-C) y el DHA (Fig. 2-D) manifiestan un ligero aumento de la producción de IFN- γ , reduciéndose en el caso del GSSG (Fig 2-C) con respecto a las células control que se encuentran en concentraciones basales de éstas.

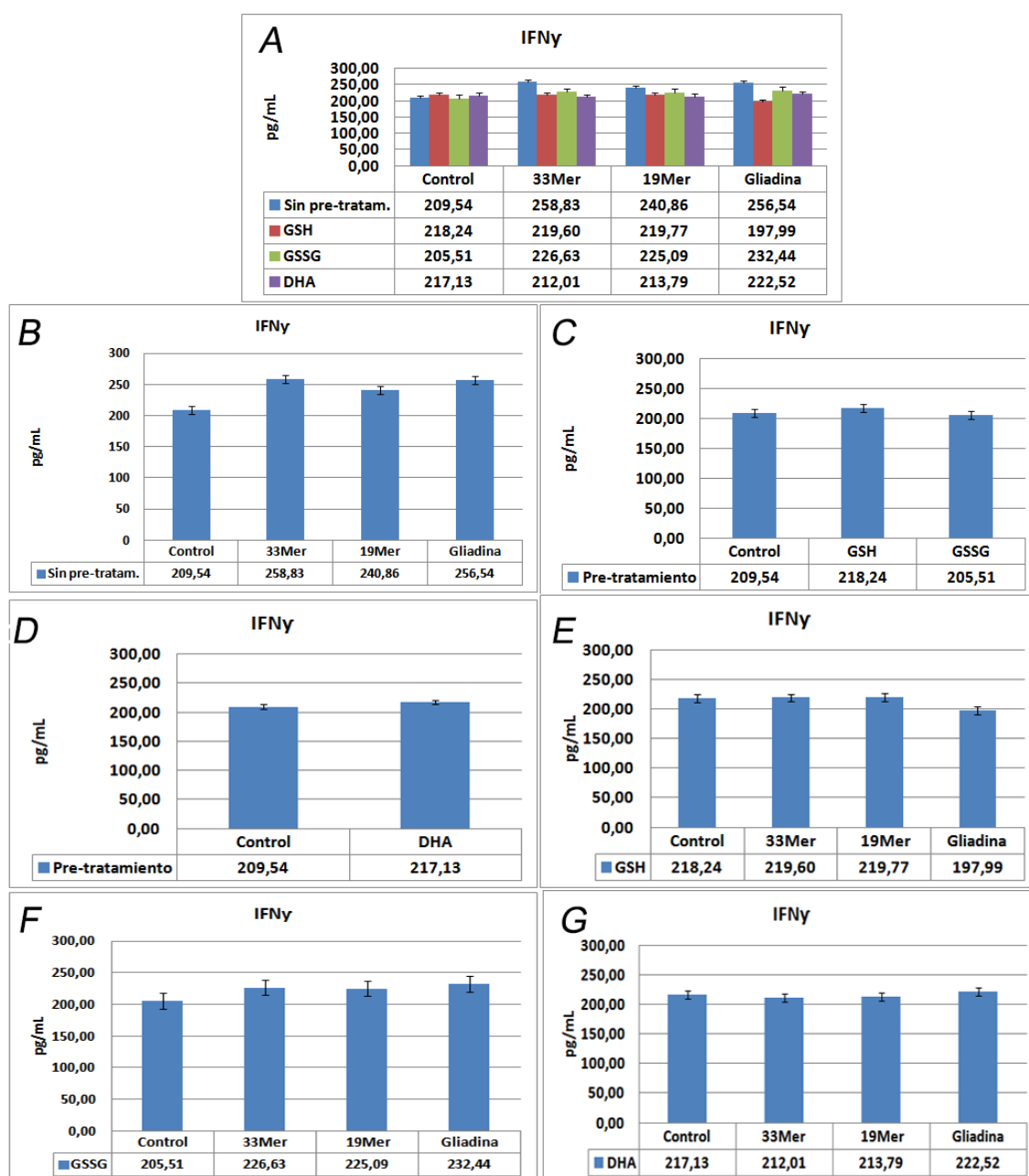


Figura 2. Histogramas que ilustran los datos espectrofotométricos de los grupos de muestras que produjeron un producto enzimático detectable por espectrofotómetro, medidas a 450nm, traducidos en pg/mL de IFN γ . Incubación de muestras con pre-tratamiento 6h antes del tratamiento posterior con péptidos y gliadina, con una duración de 24 h hasta el momento de la medición. **A-** Sumario de la producción de IFN γ de todos los grupos de pre-tratamientos y tratamientos. **B-** IFN γ (pg/mL) de las muestras sin pre-tratamiento (50ug/ml). **C-** IFN γ (pg/mL) de las muestras pre-tratadas con antioxidantes (50 μ L·5Mm). **D-** IFN γ (pg/mL) de la muestra pre-tratada con ácido docosaexanoico (DHA) (50 μ L·0.2M). **E-** IFN γ (pg/mL) de las muestras pre-tratadas con glutatión reducido (GSH). **F-** IFN γ (pg/mL) de las muestras pre-tratadas con glutatión oxidado (GSSG). **G-** IFN γ (pg/mL) de las muestras pre-tratadas con DHA.

Cuando las células son pre-tratadas con GSH y posteriormente con los péptidos, se observa que mantienen los niveles del control en las muestras tratadas con 33-mer y 19-mer, llegando incluso a disminuir en el caso de la gliadina (Fig.2-E) en comparación con el grupo de muestras que no portaban el pre-tratamiento pero si el tratamiento de los péptidos (Fig.2-B). El pre-tratamiento con GSSG (Fig.2-F), al igual que ocurre con el DHA, los niveles de liberación de IFN- γ fueron inferiores (Fig.2-F) que los que se observaron en las muestras tratadas con solo con péptidos (Fig.2-B).

En resumen, el péptido 33-mer y la molécula de gliadina son los que más producción de IFN- γ provocaron dada su naturaleza inmunogénica ya que desencadenan la inmunidad adaptativa. En cuanto a los pre-tratamientos, el GSH es la sustancia antioxidante que mejor efecto surtió en la disminución de la producción de esta citoquina que, junto al DHA, registraron valores de IFN- γ inferiores a los valores que producción de esta citoquina en las muestras que solo fueron tratadas con los péptidos (Fig.2-A).

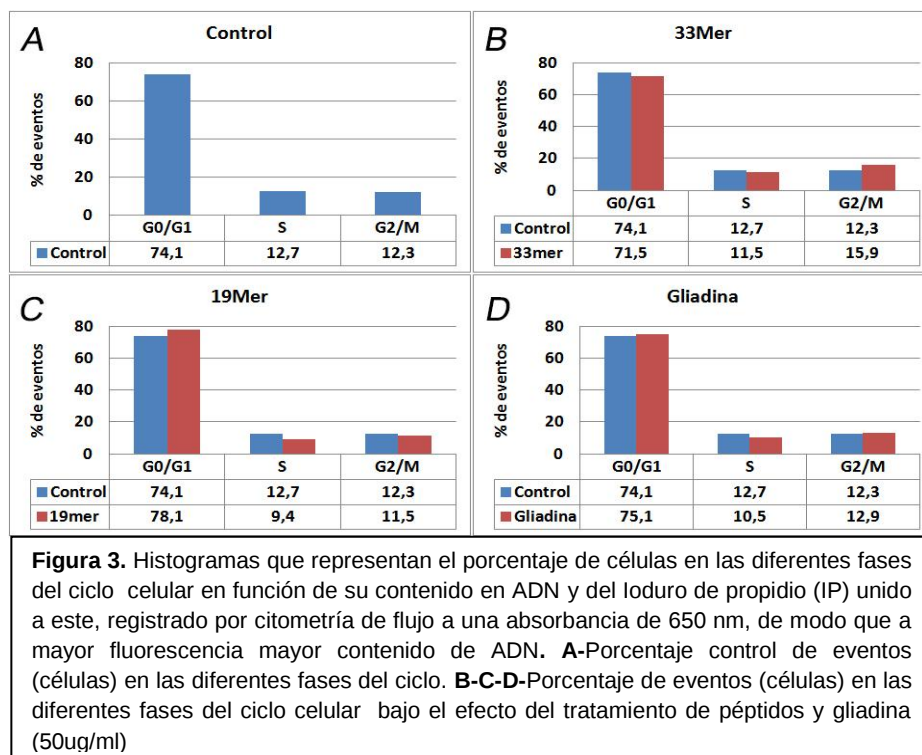
6.3. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR

Las diferentes fases del ciclo fueron observadas en los dos tipos celulares utilizados en nuestros experimentos (U937 y Caco-2) mediante la utilización del fluorocromo Ioduro de propidio (IP), el cual se adheriría, previa permeabilización de la célula, al ADN y nos permitiría valorar, en función de la cantidad fluorescencia emitida relacionada con la cantidad de ADN al que se había unido el IP, cual era la tendencia a dividirse que tenían las diferentes muestras.

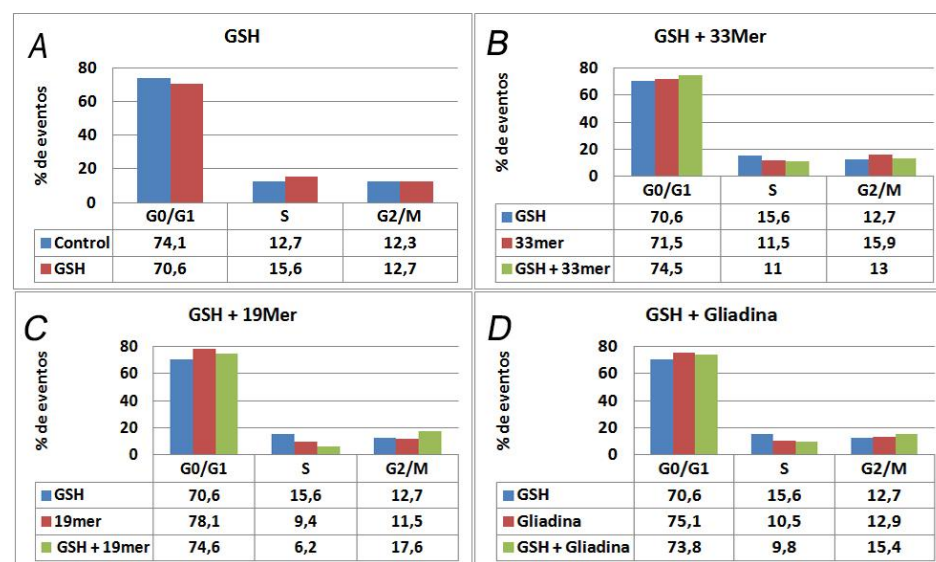
Conforme la célula avanza hacia las diferentes fases del ciclo celular, la fluorescencia emitida por una mayor unión del ioduro de propidio a las cadenas de ADN irá siendo mayor porque mayor será la cantidad de ADN que posea en su interior hasta el momento del reparto de la información genética al final de la fase M o de mitosis. De este modo, la fluorescencia emitida en esa fase será el doble que la que contenía esa misma célula en la fase G1, al inicio del ciclo.

6.3.1. LÍNEA CELULAR MONOCÍTICA U937

En la figura 3 podemos ver el efecto que ejercen los péptidos utilizados sobre el ciclo celular, así el péptido 33-mer induce un aumento en el número de células que están en fase G2/M en relación con las células control. El péptido 19-mer induce un incremento en el número de células en fase G0/G1 y la gliadina produce una disminución en el número de células en fase S en comparación con las células control.



En la figura 4 observamos el efecto que tiene el pre-tratamiento con GSH sobre el efecto de los péptidos, destacando que hay un incremento en el número de células en fase G2/M tanto en las células tratadas con el péptido 19-mer como con la gliadina. En el caso del péptido 33-mer el incremento se produce en el número de células en fase G0/G1.



Las muestras que fueron pre-tratadas con GSSG (Fig. 5-A) experimentaron una disminución del porcentaje de células en fase mitótica en comparación con las células control. En los tratamientos con 19-mer y gliadina (Fig. 5-C y D) se produce un incremento en el porcentaje de células en fase S y en fase G0/G1, respectivamente.

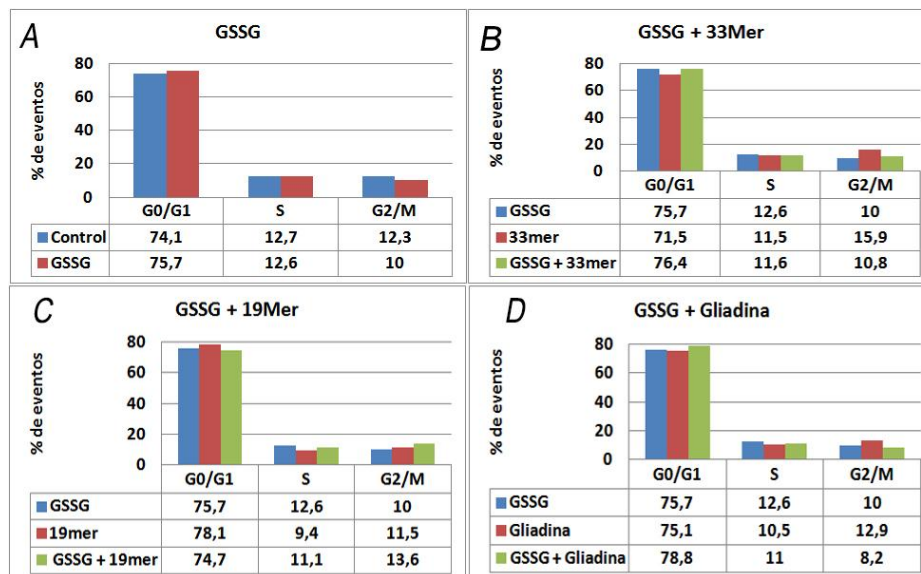


Figura 5. Histogramas que representan el porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular en función de su contenido en ADN y del Ioduro de propidio (IP) unido a este, registrado por citometría de flujo a una absorbancia de 650 nm, de modo que a mayor fluorescencia mayor contenido de ADN. **A-**Porcentaje control de eventos (células) tratados con glutatión oxidado (GSSG) (50µL·5Mm) en las diferentes fases del ciclo. **B-C-D-**Porcentaje de eventos (células) en las diferentes fases del ciclo celular bajo el efecto del pre-tratamiento con GSSG y posterior tratamiento de péptidos y gliadina(50ug/ml).

Por último, el pre-tratamiento con DHA redujo el porcentaje de células en división por debajo de los niveles controles, aumentando la retención de células en las fases tempranas del ciclo, en fase G0/G1(Fig. 6-A). En las células posteriormente tratadas con los péptidos, el 19-mer (Fig. 6-C), así como en la molécula de gliadina (Fig. 6-D) se produce un incremento en el porcentaje de células en fase S.

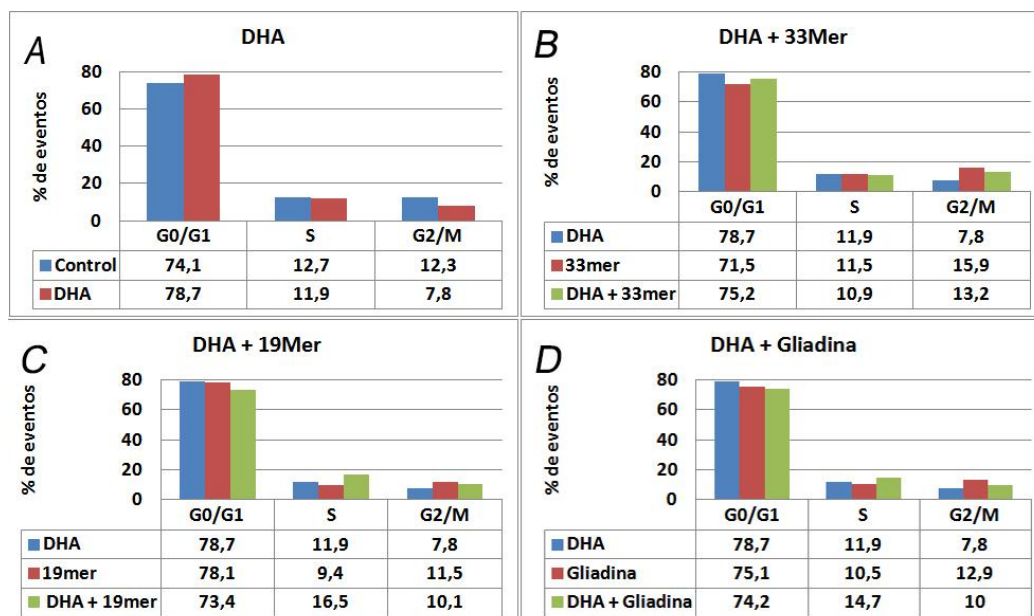


Figura 6. Histogramas que representan el porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular en función de su contenido en ADN y del Ioduro de propidio (IP) unido a este, registrado por citometría de flujo a una absorbancia de 650 nm, de modo que a mayor fluorescencia mayor contenido de ADN. **A**-Porcentaje control de eventos (células) tratados con ácido docosaexanoico (DHA) en las diferentes fases del ciclo. **B-C-D**-Porcentaje de eventos (células) en las diferentes fases del ciclo celular bajo el efecto del pre-tratamiento con DHA(50 μ L-0.2M) y posterior tratamiento de péptidos y gliadina(50ug/ml).

6.3.2 LÍNEA CELULAR EPITELIAL CACO-2

El tratamiento con el péptido 19-mer (Fig. 7-C) y la gliadina (Fig. 7-D) produce un incremento en el porcentaje de células en fase G2/M en comparación con las células control (Fig. 7-A), mientras que el péptido 33-mer (Fig. 7-B) tiene un efecto de menor incremento en el porcentaje de células en fase G0/G1 y en fase G2/M que el péptido 19-mer y la gliadina.

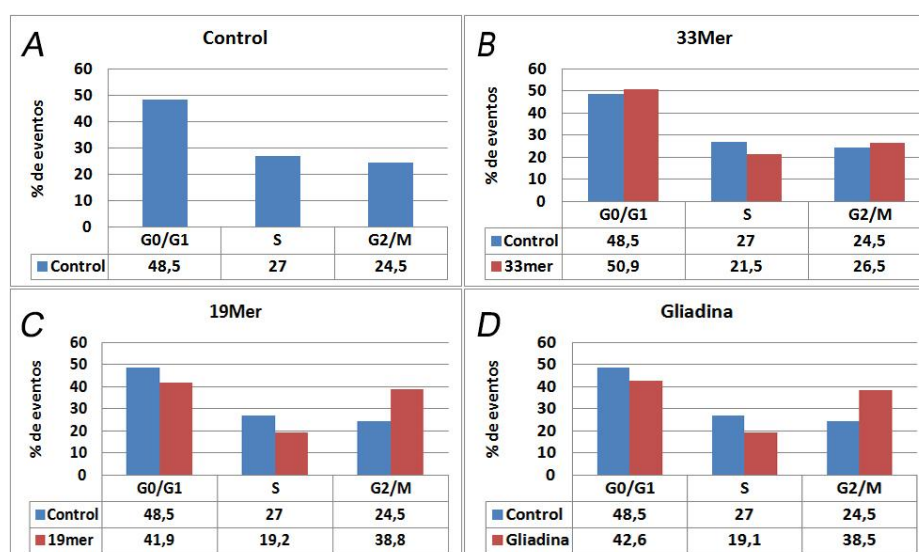


Figura 7. Histogramas que representan el porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular en función de su contenido en ADN y del Ioduro de propidio (IP) unido a este, registrado por citometría de flujo a una absorbancia de 650 nm, de modo que a mayor fluorescencia mayor contenido de ADN. **A**-Porcentaje control de eventos (células) en las diferentes fases del ciclo. **B-C-D**-Porcentaje de eventos (células) en las diferentes fases del ciclo celular bajo el efecto del tratamiento de péptidos y gliadina (50ug/ml).

En la figura 8 podemos observar el efecto que ejerce el péptido 19-mer sobre el ciclo celular, incrementado el porcentaje de células en fase S (Fig. 8-C), al igual que ocurre con la gliadina (Fig.8-D) aunque en menor medida tras el pre-tratamiento con GSH. El 33-mer induce incremento en fase S y en G2/M (Fig. 8-B).

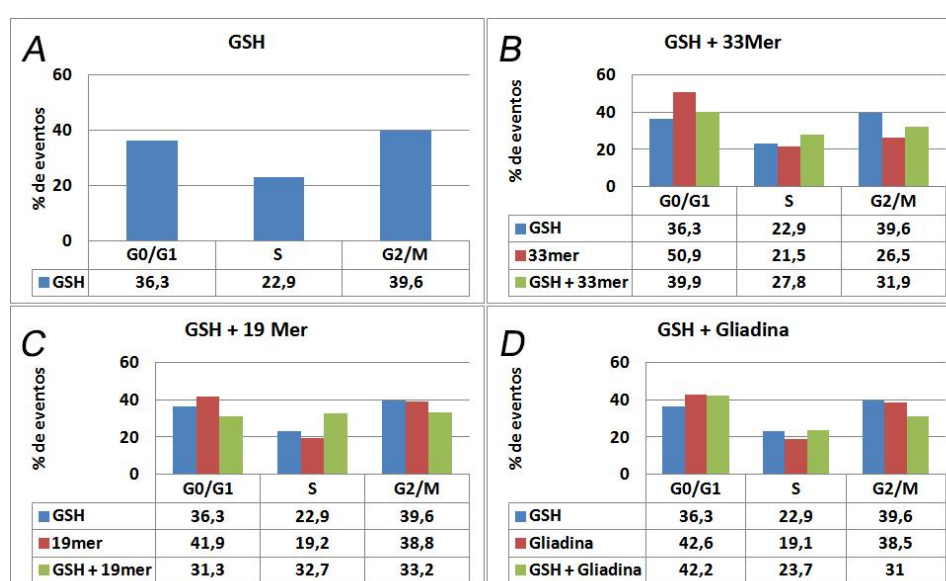


Figura 8. Histogramas que representan el porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular en función de su contenido en ADN y del Ioduro de propidio (IP) unido a este, registrado por citometría de flujo a una absorbancia de 650 nm, de modo que a mayor fluorescencia mayor contenido de ADN. **A**-Porcentaje control de eventos (células) tratados con glutatión reducido (GSH) (50μL·5Mm) en las diferentes fases del ciclo. **B-C-D**-Porcentaje de eventos (células) en las diferentes fases del ciclo celular bajo el efecto del pre-tratamiento con GSH y posterior tratamiento de péptidos y gliadina (50ug/ml).

El pre-tratamiento con GSSG genera un incremento en el porcentaje de células en fase S en respuesta al efecto del péptido 19-mer y la gliadina (Fig. 9-C y D). En el caso del péptido 33-mer, se incrementa el porcentaje en Fase G2/M (Fig. 9-B).

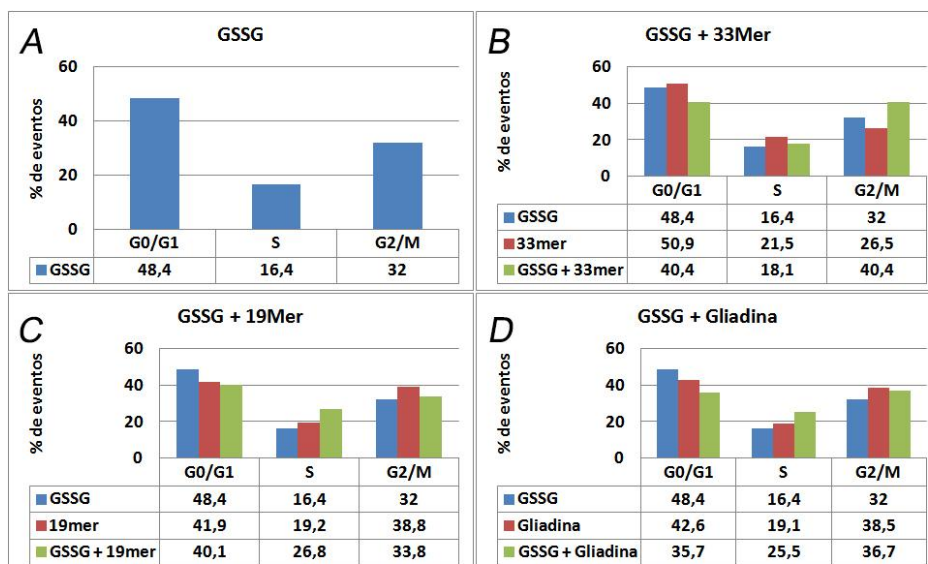


Figura 9. Histogramas que representan el porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular en función de su contenido en ADN y del Ioduro de propidio (IP) unido a este, registrado por citometría de flujo a una absorbancia de 650 nm, de modo que a mayor fluorescencia mayor contenido de ADN. **A-** Porcentaje control de eventos (células) tratados con glutatión oxidado (GSSG) (50µL·5Mm) en las diferentes fases del ciclo. **B-C-D-** Porcentaje de eventos (células) en las diferentes fases del ciclo celular bajo el efecto del pre-tratamiento con GSSG y posterior tratamiento de péptidos y gliadina(50ug/ml).

El pre-tratamiento con DHA produce un incremento en el porcentaje de células en fase G0/G1 en respuesta al daño inducido por el péptido 19-mer (Fig. 10-C), y un mayor porcentaje de células en fase S tras la administración de la gliadina (Fig. 10-D).

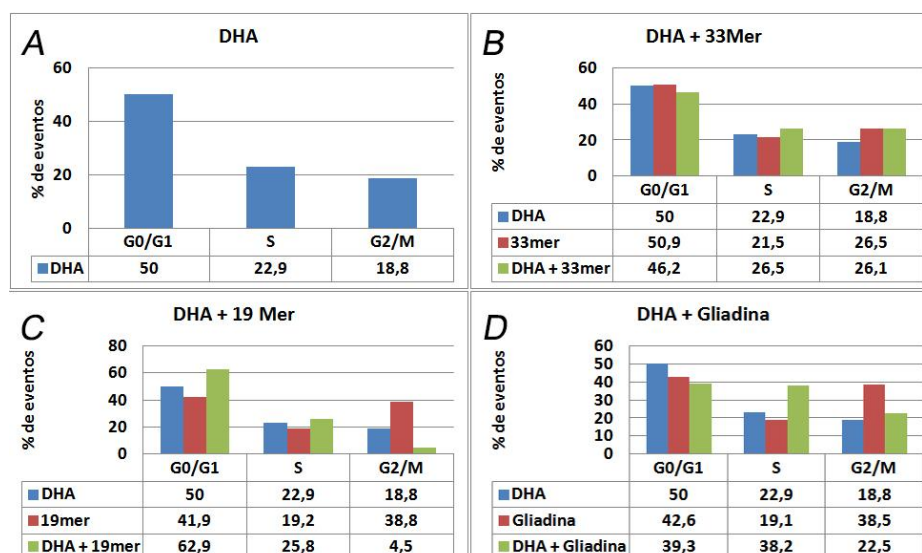


Figura 10. Histogramas que representan el porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo celular en función de su contenido en ADN y del Ioduro de propidio (IP) unido a este, registrado por citometría de flujo a una absorbancia de 650 nm, de modo que a mayor fluorescencia mayor contenido de ADN. **A-** Porcentaje control de eventos (células) tratados con ácido docosaexanoico (DHA) (50µL·0.2M) en las diferentes fases del ciclo. **B-C-D-** Porcentaje de eventos (células) en las diferentes fases del ciclo celular bajo el efecto del pre-tratamiento con DHA y posterior tratamiento de péptidos y gliadina (50ug/ml).

En resumen, el péptido que más influencia tiene sobre el ciclo celular en las células Caco-2 es el péptido 19-mer, dado su papel citotóxico no mediado inmunológicamente, y la gliadina.

6.4. ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO

En ambos tipos celulares se determinó el estado oxidativo que desencadenaban las diferentes situaciones experimentales a las que se vieron expuestas, pudiéndose visualizar para ello mediante el análisis por citometría de flujo la intensidad de fluorescencia proporcional a la producción intracelular de especies reactivas del oxígeno, al ser utilizado el fluorocromo permeable H2DCFDA (2',7'-diclorodihidrofluorescein diacetato) que emite fluorescencia al ser des-esterificada intracelularmente, convirtiéndose en una molécula altamente fluorescente.

6.4.1. LÍNEA CELULAR MONOCÍTICA U937

La administración del péptido 19-mer y la gliadina a los cultivos celulares inducen un incremento en el porcentaje de ERO en comparación con el grupo control, así determinado por el aumento en el porcentaje de fluorescencia cuantificada (Fig. 11-A). Tras los pre-tratamientos, tan solo la administración de GSH produce una disminución importante en los niveles de fluorescencia (menor proporción de ERO), incluso por debajo del grupo de células controles (Fig.11-D). En contraposición, la administración de GSSG produce un incremento muy considerable de ERO, incluso independientemente de la adición de los péptidos al medio de cultivo (Fig.11-B).

Además, con el pre-tratamiento de GSSG, el aumento de las ERO fue notablemente visible en todas las muestras tratadas con péptidos menos en el 19-mer, evidenciando la reducción de la concentración de GSH intracelular. En la muestra con GSSG (Fig. 11-E), se pudo observar el nivel de fluorescencia que, con respecto a la muestra control sin pre-tratamiento con esta forma oxidada del glutatión, parece indicar que se ha disminuido la reserva intracelular del GSH, acumulándose en la célula la forma oxidada sin poder ser retirada, esto generaría un estrés a la célula que se traduciría en ese elevado nivel de ERO.

Esto explica como en las demás muestras de péptidos pre-tratadas con GSSG, menos en la gliadina, la producción de ERO disminuye, sobre todo en 19-mer con respecto a la muestra que solo recibió el pre-tratamiento con GSSG.

El pre-tratamiento con DHA (Fig. 11-F), con o sin tratamiento con péptidos y gliadina, los niveles de ERO aumentan de forma destacable, asumiendo que a la concentración administrada, resulta ser tóxico y pro-oxidativo para las células pues el DHA en condiciones

normales suple y amortigua los fenómenos de peroxidación lipídica ocasionados por la oxidación de los lípidos de membrana.

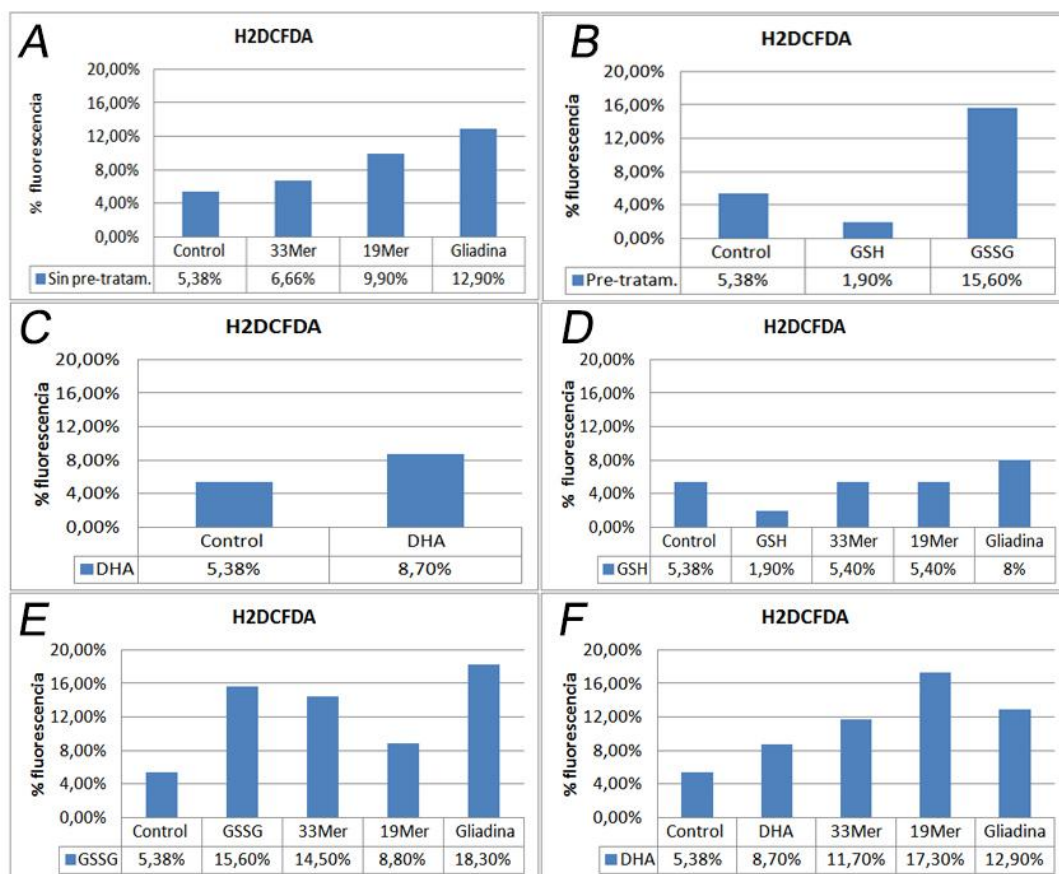


Figura 11. Histogramas que ilustran los datos citométricos de producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) obtenidos de la detección intracelular del fluorocromo 2',7'-diclorodihidrofluoresceindiacetato (H2DCFDA) a una absorbancia de 525 nm de los diferentes grupos de células U937, expresados en porcentaje de producción de ERO sobre el total de eventos que fueron analizados (5000 ± 10000 eventos). Incubación de muestras con pre-tratamiento 6h antes del tratamiento posterior con péptidos y gliadina, con una duración de 24 h hasta el momento de la medición. **A-** Producción de ERO de muestras control tratadas con péptidos y gliadina (50ug/ml). **B-** Producción de ERO de las muestras control pre-tratadas con antioxidantes (50μL·5Mm). **C-** Producción de ERO de la muestra pre-tratada con ácido docosaexanoico (DHA) (50μL·0.2M). **D-** Producción de ERO de las muestras pre-tratadas con glutatión reducido (GSH). **E-** Producción de ERO de las muestras pre-tratadas con glutatión oxidado (GSSG). **F-** Producción de ERO de las muestras pre-tratadas con DHA.

En la figura 12 resumimos los resultados obtenidos sobre la producción de ERO por parte de las células U937 en respuesta a los péptidos derivados de la gliadina, y tras la administración de sustancias de naturaleza antioxidante. En este sentido, los tratamientos que inducen una mayor producción de ERO fueron la gliadina y 19-mer, este último es considerado como uno de los péptidos más tóxicos de entre la gliadina y el que media el daño celular de forma más directa. En los pre-tratamientos: el GSH media la disminución en la producción de ERO en todas las muestras pero sobre todo en las que los péptidos resultan ser más dañinos a nivel celular, 19-mer y gliadina. El GSSG ejerció un efecto paliativo en las muestras tratadas con 19-mer y en menor medida en 33-mer, resultando ser

altamente tóxico en las muestras tratadas con gliadina a la concentración administrada. El DHA, en la concentración administrada resultó ser tóxico y altamente oxidante en el caso del 19-mer. En general, tanto el GSSG como el DHA, en las concentraciones administradas, ejercen más como agentes oxidantes, provocando un aumento de las ERO y un desbalance del equilibrio redox.

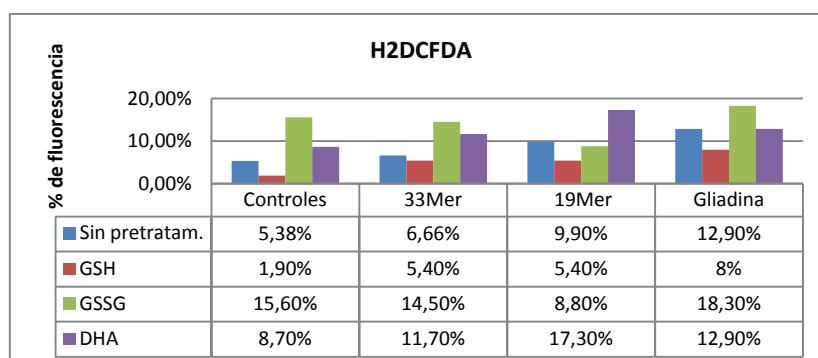


Figura 12. Histograma sumario que ilustra los datos citométricos de producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) obtenidos de la detección intracelular del fluorocromo 2',7'-diclorodihidrofluoresceindiacetato (H2DCFDA) a una absorbancia de 525 nm de los diferentes grupos de células U937, expresados en porcentaje de producción de ERO sobre el total de eventos que fueron analizados (5000±10000 eventos). Incubación de muestras con pre-tratamiento de los antioxidantes (50µL·5Mm) y el ácido graso (50µL·0.2M) 6h antes del tratamiento posterior con péptidos y gliadina(50ug/ml), con una duración de 24 h hasta el momento de la medición.

6.4.2. LÍNEA CELULAR EPITELIAL CACO-2

Tras la aplicación y análisis de los diferentes tratamientos sobre este tipo celular, se pudo observar que el patrón oxidativo de este tipo celular varía con respecto al anterior. La producción ERO solo se incrementó en las células tratadas con gliadina (Fig. 13-A), mientras que los péptidos 19-mer y 33-mer presentan valores similares al grupo de células control. El GSH tiene el efecto de disminuir el porcentaje ERO por debajo de los niveles controles, a diferencia del GSSG y DHA que lo incrementan, posiblemente por la toxicidad que ejerce el desbalance redox de la relación GSH/GSSG y por una acumulación de DHA en los compartimentos lipídicos (Fig. 13-B y C).

Por último, en las células pre-tratadas con los antioxidantes y DHA junto con el tratamiento con los péptidos: destacamos, por un lado, el efecto que produce en las células la administración previa de GSH y la adición posterior del péptido 19-mer que se traduce en un incremento significativo del porcentaje de fluorescencia (ERO) (Fig. 11-D) y por otro, el pre-tratamiento con GSSG y DHA produce un incremento significativo en el porcentaje de fluorescencia tras la administración de la gliadina (fig. 13-E y F).

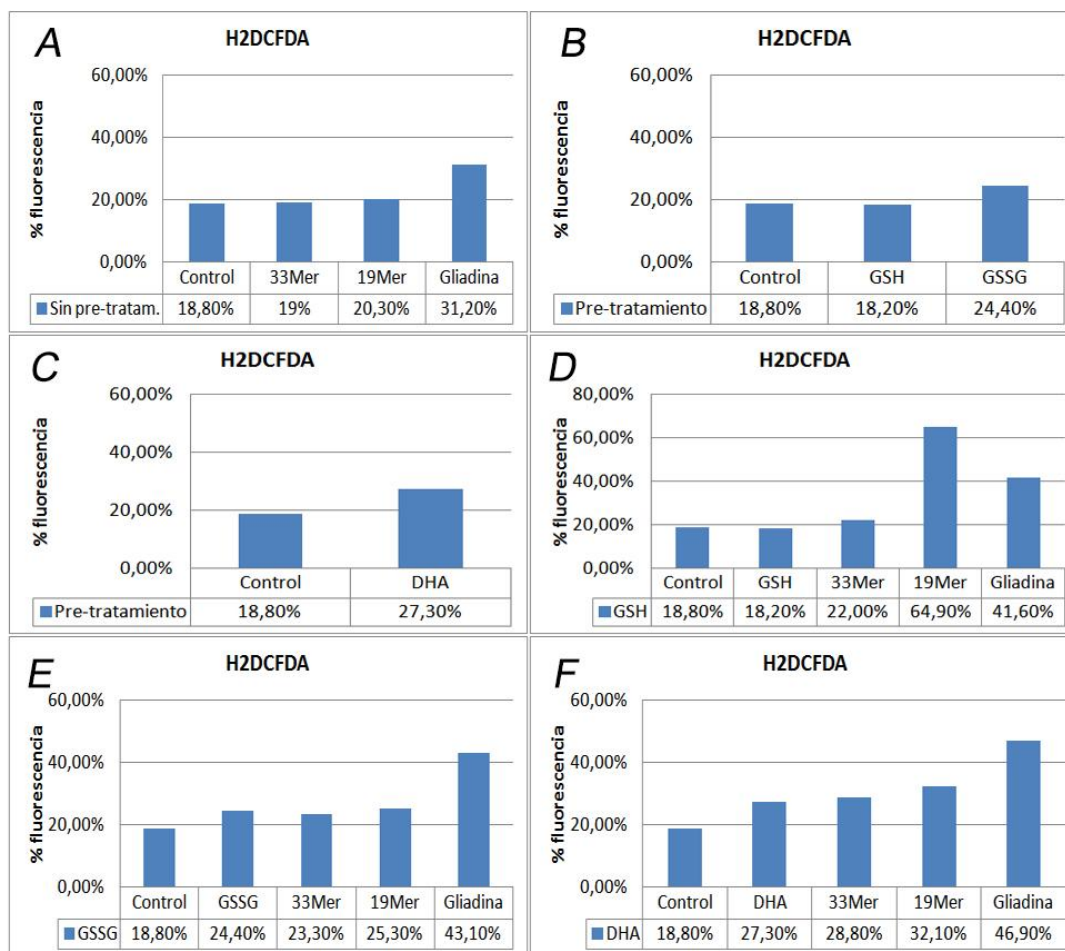


Figura 13. Histogramas que ilustran los datos citométricos de producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) obtenidos de la detección intracelular del fluorocromo 2',7'-diclorodihidrofluoresceindiacetato (H2DCFDA) a una absorbancia de 525 nm de los diferentes grupos de células Caco-2, expresados en porcentaje de producción de ERO sobre el total de eventos que fueron analizados (5000±10000 eventos). Incubación de muestras con pre-tratamiento 6h antes del tratamiento posterior con péptidos y gliadina, con una duración de 24 h hasta el momento de la medición. **A-** Producción de ERO de muestras control tratadas con péptidos y gliadina (50ug/ml). **B-** Producción de ERO de las muestras control pre-tratadas con antioxidantes (50μL·5Mm). **C-** Producción de ERO de la muestra pre-tratada con ácido docosaexanoico (DHA) (50μL·0.2M). **D-** Producción de ERO de las muestras pre-tratadas con glutatión reducido (GSH). **E-** Producción de ERO de las muestras pre-tratadas con glutatión oxidado (GSSG). **F-** Producción de ERO de las muestras pre-tratadas con DHA.

En resumen, en la producción de especies reactivas del oxígeno (Fig. 14), en las células Caco-2, tiene una clara implicación los desbalances del equilibrio redox que desencadena una desproporcionada acumulación de especies antioxidantes y DHA, siendo el principal motivo de la liberación de tales especies.

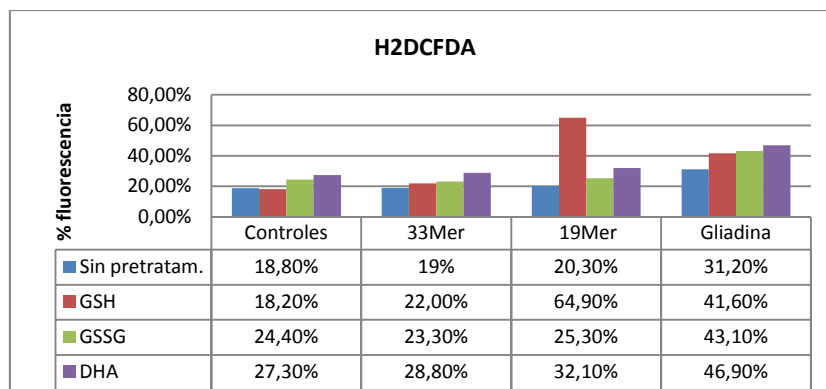


Figura 14. Histograma sumario que ilustra los datos citométricos de producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) obtenidos de la detección intracelular del fluorocromo 2',7'-diclorodihidrofluoresceindiacetato (H2DCFDA) a una absorbancia de 525 nm de los diferentes grupos de células Caco-2, expresados en porcentaje de producción de ERO sobre el total de eventos que fueron analizados (5000±10000 eventos). Incubación de muestras con pre-tratamiento con los antioxidantes (50µL-5Mm) y el ácido graso(50µL-0.2M) 6h antes del tratamiento posterior con péptidos y gliadina(50ug/ml), con una duración de 24 h hasta el momento de la medición.

6.5. DESORGANIZACIÓN DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE CÉLULAS U937

Se llevó a cabo la evaluación del estado de la membrana lipídica con el conocimiento de que la fase inicial del daño celular se caracteriza por una pérdida en la simetría de los fosfolípidos de membrana que provoca el inicio de la apoptosis celular. Mediante el uso de Merocianina 540, un colorante hidrofóbico y lipofílico, muy sensible a los cambios en la conformación de la membrana, podemos cuantificar la desorganización de la misma que se correlaciona con un mayor porcentaje de fluorescencia emitida.

El péptido 19-mer, dada la particularidad de ejercer su papel citotóxico de forma directa sobre la célula, desencadena una mayor desorganización de la membrana, seguido de la gliadina y del péptido 33-mer en comparación con las células control (Fig. 15-A). La administración de GSH, GSSG y DHA apenas tiene efecto sobre la membrana lipídica en las células U937 (Fig. 15-B y C).

En cuanto a lo que respecta a las células pre-tratadas con GSH, GSSG y DHA y posteriormente tratadas con los péptidos y gliadina, destacamos, tal como se indica en la Figura 15-D, el efecto que produce la administración de GSSG y la gliadina que se traduce en un incremento significativo del porcentaje de fluorescencia emitida por las células y la disminución en el porcentaje de fluorescencia que observamos tras la administración de GSH y DHA más los péptidos 19-mer, 33-mer y gliadina (Fig.15-E y F).

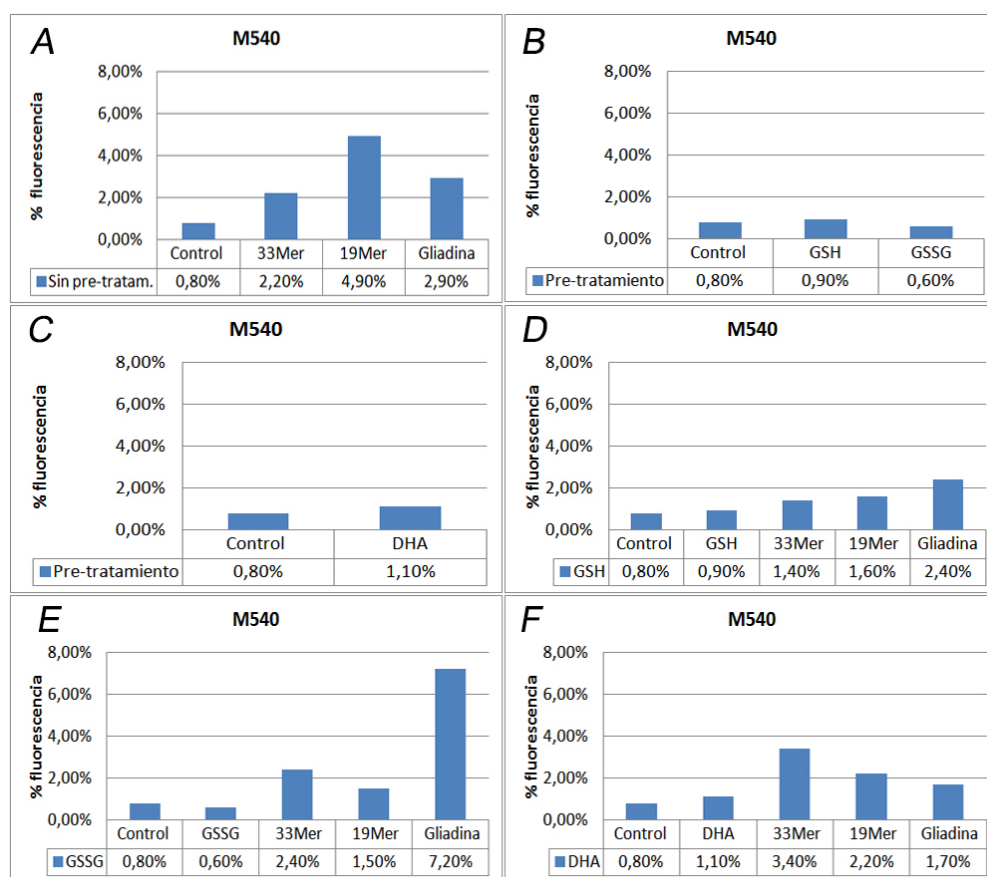
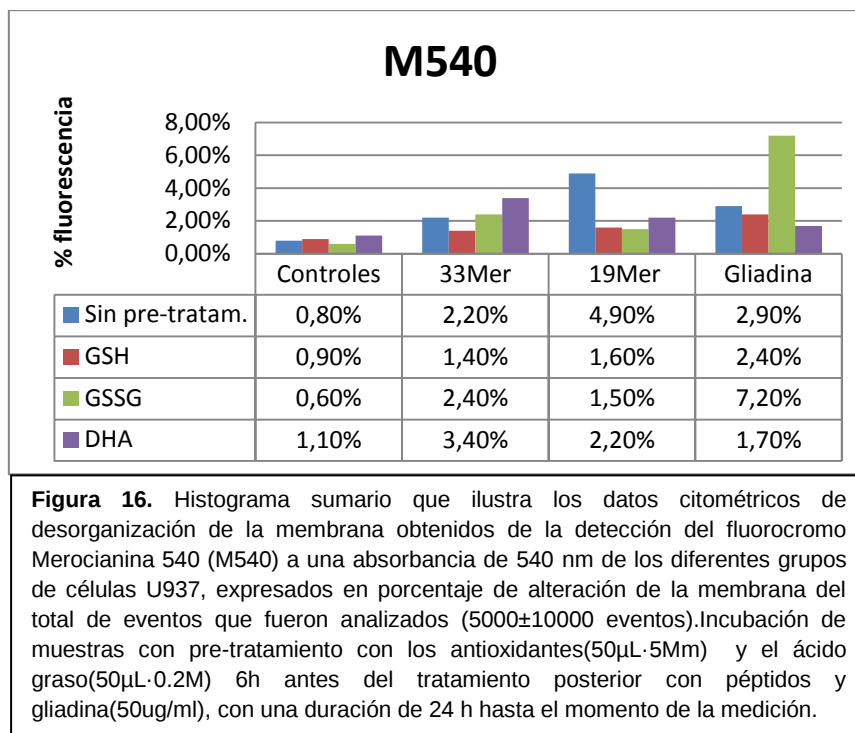


Figura 15. Histogramas que ilustran los datos citométricos de la desorganización de la membrana plasmática obtenidos mediante la detección del fluorocromo Merocianina 540 (M540) a una absorbancia de 540 nm de los diferentes grupos de células U937, expresados en porcentaje de alteración de la membrana sobre el total de eventos (células) que fueron analizados (5000±10000 eventos). Incubación de muestras con pre-tratamiento 6h antes del tratamiento posterior con péptidos y gliadina, con una duración de 24 h hasta el momento de la medición. **A-** Desorganización de la membrana en muestras control tratadas con péptidos y gliadina (50ug/ml). **B-** Desorganización de la membrana en las muestras control pre-tratadas con antioxidantes (50µL·5Mm). **C-** Desorganización de la membrana en la muestra pre-tratada con ácido docosaexanoico (DHA) (50µL·0.2M). **D-** Desorganización de la membrana en las muestras pre-tratadas con glutatión reducido (GSH). **E-** Desorganización de la membrana en las muestras pre-tratadas con glutatión oxidado (GSSG). **F-** Desorganización de la membrana en las muestras pre-tratadas con DHA.

En resumen (Fig-16) el péptido 19-mer, el péptido más citotóxico de los utilizados en nuestros experimentos, induce el mayor índice de desorganización de lípidos de membrana en las células U937. GSH y DHA tienen un efecto positivo disminuyendo los niveles de desorganización lipídica inducida por los péptidos derivados de la gliadina, este efecto es mayor para el péptido 33-mer y 19-mer en el caso de GSH y para el 19-mer y gliadina en el caso de DHA.



7. DISCUSIÓN

En nuestro estudio *in vitro* hemos utilizado líneas celulares establecidas de naturaleza epitelial y del sistema inmune para comprobar los efectos tóxicos e inmunitarios que desencadenan los péptidos derivados de la gliadina y cómo reaccionan estos a ciertas sustancias de carácter antioxidante, y consideradas como beneficiosas para un estado celular estable. En la enfermedad celíaca, ciertas secuencias de la gliadina, péptidos tóxicos como P31-49(19-mer), se introducen vía endocítica en las células y las afecta por la activación de la respuesta innata, mientras que, péptidos inmunogénicos como P56-88 (33-mer), contienen epítomos en los que se ha visto que inducen la respuesta adaptativa por la estimulación de clones de células T. Se sabe que el péptido 33-mer es un súper estimulante para las células T gracias a un estudio de Shan *et al.* (2002), tal y como ha sido verificado en nuestros datos de proliferación y actividad del ciclo en células U937, donde las células desencadenaban una mayor respuesta y eran más sensibles a este péptido que al 19-mer. Los datos de Fleckenstein *et al.* (2002) y Qiao *et al.* (2004) nos proporcionaron una idea de por qué el péptido 33-mer es el estimulador más potente de células T que otros péptidos más cortos.

Una de las características de la enfermedad celíaca es la producción de IFN- γ por parte de las células del sistema inmune sensibles a la gliadina para mantener activa la respuesta adaptativa e innata. En nuestro estudio, su producción se vio aumentada en U937

en la muestra que fue tratada con el péptido 33-mer además de la gliadina, poniendo en evidencia la respuesta inmunogénica a la que tuvieron que hacer frente las células al entrar en contacto tanto con el péptido aislado como con el conjunto de péptidos de la gliadina. Los tres pre-tratamientos aplicados a éstas reducen la producción de IFN- γ , pero esa disminución se hace más patente en los grupos pre-tratados con glutatión reducido (GSH) y con (DHA), destacando cierto efecto anti-proliferativo en el glutatión oxidado (GSSG). En monocitos humanos, como células THP-1, el IFN- γ incrementa los niveles intracelulares de GSH y disminuye los de GSSG, resultando en un incremento en la relación GSH/ GSSG tal y como ocurre en nuestros resultados, los cuales, en células U937, al verse expuestas al péptido inmunogénico 33-mer sin pre-tratamiento, inducen una mayor producción de esta citoquina (IFN- γ) que el resto de tratamientos, correlacionándose con el análisis de las especies reactivas del oxígeno (ERO) las cuales mostraron un índice menor de producción de especies reactivas del oxígeno que el resto de péptidos sin pre-tratamiento.

Un aumento en el índice proliferación con respecto al control ha sido puesto de manifiesto en nuestro estudio cuando las células U937 fueron tratadas con el péptido 33-mer y con los péptidos digeridos de la gliadina en respuesta al estímulo inmunogénico que desencadena, dando un índice de proliferación celular más alto con respecto al 19-mer al que este tipo celular es menos susceptible y su índice de proliferación celular, por ende, es menor. Los pre-tratamientos con antioxidantes y DHA a los que se ven expuestos resultan en una disminución variable en el índice de proliferación, destacando el glutatión oxidado (GSSG), el cual desencadena una disminución del índice de proliferación celular incluso en la muestra que no fue tratada con péptidos, considerada como basal, poniendo de manifiesto cierto papel anti-proliferativo.

Desde que se sabe que el GSSG *per se* es una molécula no muy permeable a la membrana, debe ejercer sus efectos tóxicos mediante la oxidación de residuos específicos de cisteína en el lado externo de la membrana plasmática. El tratamiento con GSSG lleva a una inducción de apoptosis dependiente de la dosis en células U937. Un estudio de Filomeni *et al.* (2002) examinó que células U937 tratadas con GSSG (5Mm) tienen los rasgos característicos de núcleos apoptóticos dependiente del tiempo de incubación, mostrándose actividad caspasa C a las 18 h. Nuestros resultados del pre-tratamiento con GSSG derivaron en una disminución dependiente de la dosis de la concentración de glutatión reducido o GSH. El desequilibrio redox (GSH/GSSG) resulta en un aumento del flujo de especies reactivas del oxígeno (ERO) detectado por el fluoróforo 2',7'-diclorodihidrofluorescein diacetato (H2DCFDA) en células U937 tratadas con GSSG, las cuales tenían niveles de fluorescencia marcadamente altos, debido este aumento, a que la reserva intracelular de GSH comienza a disminuir. Así pues, este desbalance del equilibrio GSH/GSSG que genera

esta sustancia unido a los efectos citotóxicos de los péptidos de la gliadina, así como las respuestas que ejercen las células, desencadena un efecto dual que desemboca en un potenciamiento del daño celular, puesto de manifiesto en nuestros resultados. Por lo tanto, GSSG añadido externamente era capaz de desencadenar la muerte celular por la activación de una respuesta de estrés oxidativo, a través de la alteración del sistema tampón redox GSH / GSSG intracelular y el aumento de la producción de ERO.

Muchos estudios han mostrado que el tratamiento *in vitro* con DHA reduce la proliferación celular y produce a su vez efectos variables dependiendo de la concentración a la que es administrada. Nuestros resultados sugieren que el DHA, a la dosis administrada (0.2 M) es una dosis superior a la empleada en otros estudios previos, siendo por tanto una concentración superior a la óptima para obtener una respuesta positiva para las células. En este sentido, podemos comprobar que la administración de DHA produce un incremento en ERO y un mayor desequilibrio del balance redox intracelular. Los ácidos grasos son componentes de los fosfolípidos de membrana, la naturaleza de la reserva de ácido graso intracelular puede influir en el grado de saturación de los ácidos grasos en los fosfolípidos de las membranas celulares, y esto podría resultar en un cambio en la fluidez de la membrana. Es posible que la fluidez alterada de la membrana pudiera causar inhibición de una o más de las funciones esenciales para las células con el consecuente posterior proceso citolítico de la célula. La serie E- de prostaglandinas (PGE1 y PGE2) se ha demostrado que inhiben diversas funciones de las células T, incluyendo la citotoxicidad mediada por células T *in vitro* (Hwang, 1989). Un aumento de la producción de peróxidos de lípidos consiguiente de la suplementación ácidos grasos esenciales también puede contribuir al efecto inmunosupresor de estos ácidos grasos, ya que los productos de peroxidación de lípidos tales como H₂O₂ se han demostrado que tienen un efecto supresor sobre la proliferación de linfocitos. Los resultados de Purasiri *et al.* (1997) sugieren de que el tratamiento *in vitro* con DHA (70 µg/ml durante 24-48 h) puede inhibir una variedad de reactividades inmunológicas, tanto humoral como mediada por células. Estos hallazgos documentan la modulación de la citotoxicidad, la transformación y la proliferación celular y la inducción de la producción de citoquinas (IFN- γ) *in vitro*.

Entre las alteraciones morfológicas atribuidas a los péptidos de la gliadina en la línea celular Caco-2 se encuentra una reducción en el crecimiento celular y la viabilidad (Dolfini *et al.*, 2002); aglutinación celular (De Vincenzi *et al.*, 1998); la inducción de la apoptosis a través de la vía ligando Fas-Fas (Giovannini *et al.*, 2003); aumento de la producción de óxido nítrico y la alteración del equilibrio oxidativo (Clemente *et al.*, 2003); disminución de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (Giovannini *et al.*, 1997); reorganización de los filamentos intracelulares de actina (Clemente *et al.*, 2003); y la saturación de las células

dendríticas (Nikulina *et al.*, 2004). Nuestros resultados y los postulados que preceden los diferentes estudios previos parecen enfocar que existe un daño patente de los péptidos de la gliadina a las células Caco-2 que se traduce en una tasa de reposición celular aumentada, consecuencia de los daños a diferentes niveles que sufren. El mecanismo por el cual la gliadina produce esa serie de daños bien caracterizados en la actualidad se debe en gran medida, a los cambios fisicoquímicos de los enterocitos y a la acción citotóxica directa de péptidos de gliadina, como el 19-mer y otros péptidos más cortos que lo conforman contra enterocitos.

Estudios previos sobre qué respuesta muestran las células Caco-2 en el ciclo celular pusieron de manifiesto el papel regulador de la dirección oxidativa o reductora que adoptase la célula, favoreciendo el estrés oxidativo a la quiescencia, a la proliferación o la muerte celular, llevado a cabo por Contgreave *et al.* (1998). La inducción de cambios oxidativos en el estado redox celular puede incitar respuestas apoptóticas. Un estudio de Gotoh *et al.*, (2002) demostró que la inducción del desequilibrio redox promueve la proliferación celular en Caco-2 y la progresión del ciclo celular, lo que indica la importancia del estado redox celular en la modulación de la actividad proliferativa de células intestinales y, tal y como ha sido puesto de manifiesto en nuestro estudio, ese desbalance redox que desencadenó tanto la gliadina como el que empezaba a dar señal la muestra con 19-mer en Caco-2 hacia la producción de especies reactivas se vio reflejado en la actividad del ciclo.

Varios estudios han demostrado que las especies reactivas del oxígeno (ERO) y el estrés oxidativo están fuertemente asociados con la enfermedad celíaca (Dugas *et al.*, 2003; Maiuri *et al.*, 2003). Varios mecanismos de defensa están implicados en el mantenimiento de la integridad celular y la homeostasis del tejido: el intestino es capaz de retener altas concentraciones de antioxidantes (GSH, vitaminas E, C, ácidos grasos) para aumentar las enzimas Aldehído oxidasa, mientras que la apoptosis es inducida en enterocitos dañados (Aw, 1999). Se demostró que la xantina oxidasa (XO), una enzima que cataliza una serie de reacciones de oxidación, se activa en los enterocitos de los pacientes celíacos, lo que conduce a la sobreproducción de radicales libres y ERO (Boda *et al.*, 1999). Estos procesos pro-oxidantes pueden causar un mayor daño a la mucosa intestinal a través de la reacción en cadena de radicales libres en la lipoperoxidación y el nivel de lipoperóxidos (LOOH) elevados, que puede tener efectos de largo alcance en la homeostasis metabólica intestinal. Rivabene *et al.* (1999), informó de un mayor nivel de LOOH y una disminución del nivel de GSH provocado por la gliadina del trigo en un estudio *in vitro*. Se demostró que un alto nivel de LOOH provoca roturas en el ADN de una y doble cadena, así como el daño oxidativo de las membranas celulares (Wijeratne y Cuppett, 2006). Concentraciones subtóxicas de LOOH pueden causar un cambio oxidativo en el estado redox celular que es suficiente para una

respuesta mitogénica, mientras que bajo un estrés oxidativo severo las células mueren por apoptosis o necrosis (Gotoh *et al.*, 2002; Aw, 1999). El ciclo redox GSH/GSSG es el principal mecanismo de desintoxicación de lipoperóxidos en el intestino (Aw, 2005). Los altos niveles de GSH celular se conservan por síntesis de novo, la regeneración a través GSSG, y en varios tipos celulares, incluyendo los enterocitos, por una importación a través de sistema de transporte dependiente de Na⁺ (Mårtensson *et al.*, 1990). Nuestros resultados se centran en el efecto que tienen los péptido 33-mer y 19-mer llevado a cabo en nuestros estudios *in vitro*, y lo hemos comparado con la gliadina de la que se conoce su efecto por estudio previos y recogidos en la bibliografía. Hemos demostrado el efecto que ejerce el péptido 19-mer sobre la reserva intracelular antioxidante de GSH unido al desbalance del equilibrio redox inherente a éste, creando una sensibilización mayor al péptido y, por otro lado, podemos determinar que GSSG puede estar agotando la reserva intracelular de GSH que junto con el efecto citotóxico del péptido 19-mer y 33-mer ocasiona una producción y consecuente liberación de ERO al medio intracelular.

Rivabene *et al.*(1999) demostró en diversos tipos celulares que el efecto de la gliadina se asocia con cambios pro-oxidantes, como el nivel LOOH elevado, niveles reducidos de GSH y progresiva desaparición de grupos sulfhidrilo en proteínas. La magnitud de estos cambios se correlacionaron con el estado redox basal de las células, principalmente el contenido de GSH, lo que sugiere que, en nuestro caso en U937, los niveles de GSH más altos podrían disminuir la susceptibilidad celular a la gliadina como además Stojiljković *et al.* (2012) demostró en su estudio. En otro estudio *in vitro*, la gliadina provocó una reducción en el contenido de GSH (Elli *et al.*, 2003).

La alteración del equilibrio GSSG/GSH es capaz de desencadenar una serie de modificaciones en la estructura y función de la membrana que, a su vez, puede afectar a la vía de transducción de señales implicada en el control del ciclo celular. Para explicar tal en efecto *in vitro*, dos aspectos diferentes deben ser considerados: la liberación de lipoperóxidos dentro de las células, y la translocación de la fosfatidilserina desde la cara interna hacia el lado extracelular de la membrana plasmática. Virgili *et al.* (1998) demostró el aumento de los niveles de los productos de la peroxidación lipídica, y la baja regulación de la proliferación celular. Además Urano *et al.* (1988) establecieron que los daños en los ácidos grasos poliinsaturados pueden conducir a cambios tanto en la fluidez de membrana y características de permeabilidad.

Estudios *in vitro* de U937 han demostrado que el EPA y DHA pueden inducir la muerte celular o apoptosis a través de vía mitocondrial (Kim *et al.*, 2005). En la vía apoptótica, el colapso del potencial de membrana mitocondrial (MMP) es un evento común

que conduce a la disfunción mitocondrial y la producción de ERO (Arita *et al.*, 2001). Los ácidos grasos poliinsaturados n-3 son conocidos por ser capaces de interrumpir la MMP, inducir ERO, y sensibilizar a las células tumorales (Arita *et al.*, 2001). Se encontró que el tratamiento de células U937 con DHA para ser asociado con un aumento en la producción de ERO que tuvo lugar en tan solo un minuto. Además, Tras 1 hora de exposición de las células a DHA causó un aumento significativo en la actividad caspasa-3. Esto está de acuerdo con estudios previos que muestran que la apoptosis inducida por el DHA fue mediada por un aumento en la producción de ERO intracelular y en la actividad caspasa-3 (Kim *et al.*, 2005). Se ha demostrado que el DHA es eficaz para contrarrestar los efectos de la gliadina en las células epiteliales intestinales a una concentración más baja de 2 mM. Cabe destacar que la alta concentración de DHA generalmente por encima 100mM tiene un efecto nocivo sobre las células, aumentando la tasa de peroxidación de los lípidos de membrana, estrés oxidativo y el daño celular en general (Shoji *et al.*, 2009). Esto se puede observar en nuestros resultados en Caco-2 y U937 en el grupo de pre-tratamiento con DHA (0.2M) en el análisis de las especies reactivas del oxígeno, por lo que el efecto de este ácido graso va a estar determinado por la concentración a la que ésta es administrada ya que, superándose ciertos umbrales, comienza a sensibilizar a las células a los efectos de los péptidos.

8. CONCLUSIONES

La administración de péptidos 19-mer y 33-mer en los cultivos celulares de U937 producen un aumento en el índice proliferación celular (IPC), un incremento en la producción de IFN- γ (pg/mL) y de producción de especies reactivas del oxígeno y una importante desorganización de la membrana lipídica que demuestra el potencial citotóxico e inmunogénico de estos péptidos derivados de la gliadina.

Las células Caco-2 resultan ser más sensibles a los efectos citotóxicos directos de los péptidos 19-mer y 33-mer utilizados en nuestro trabajo experimental que las células U937. Siendo el péptido 19-mer el que produce un mayor daño celular.

El pre-tratamiento con GSH amortigua y repara los efectos nocivos desarrollados por los péptidos 19-mer y 33-mer sobre las células Caco-2 y U937. Teniendo un papel antioxidante y anti-proliferativo en respuesta al daño inducido por los péptidos derivados de la gliadina.

El pre-tratamiento con GSSG y DHA, debido a las altas concentraciones utilizadas en nuestro estudio hacen a las células más susceptibles al daño inducido por el péptido 33-mer y 19-mer.

En la producción de especies reactivas del oxígeno tiene una clara implicación los desbalances del equilibrio redox que desencadena una desproporcionada acumulación intracelular de GSSG y DHA, potenciado por el efecto de los péptidos 19-mer y 33-mer.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. **Arita K., Kobuchi H., Utsumi T., Takewara Y., Akiyama J., Horton A.A., Utsumi K.** 2001. Mechanism of apoptosis in HL-60 cells induced by n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Biochem Pharmacol* 62:821–828.
2. **Auricchio S., Barone M.V., Troncone R.** 2004. Dietary proteins and mechanisms of gastrointestinal diseases: Gliadin as a model. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 39, S738–S739.
3. **Aw T.Y.** 1999. Molecular and cellular responses to oxidative stress and changes in oxidation-reduction imbalance in the intestine. *Am J Clin Nutr* 70: 557-565.
4. **Beckett C.G., Dell'Olio D., Ellis H.J., Rosen-Bronson S., Ciclitira P.J.** 1998. The detection and localization of inducible nitric oxide synthase production in the small intestine of patients with coeliac disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 10, 641–647.
5. **Boda M., Németh I., Boda D.** 1999. The caffeine metabolic ratio as an index of xanthine oxidase activity in clinically active and silent celiac patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 29: 546-550.
6. **Calder P.C.** 2011. Fatty acids and inflammation: The cutting edge between food and pharma. *Eur. J. Pharmacol.*, 668, 50–58.
7. **Calder P.C.** 2004. n-3 Fatty acids, inflammation, and immunity—relevance to postsurgical and critically ill patients. *Lipids* 39:1147–1161.
8. **Cianci R., Cammarota G., Frisullo G. et al.** 2012. Tissue-infiltrating lymphocytes analysis reveals large modifications of the duodenal immunological niche in coeliac disease after gluten-free diet,” *Clinical and Translational Gastroenterology*, vol. 3, article 28.
9. **Clemente M.G., De Virgiliis S., Kang J.S. et al.** 2003. Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut*; 52:218–23.
10. **Contgreave I. A., Gerdes R. G.** 1998. Recent trends in glutathione biochemistry-glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242, 1–9
11. **Daniels I., Cavill D., Murray I.A., Long R.G.** 2005. Elevated expression of iNOS mRNA and protein in coeliac disease. *Clin. Chim. Acta*, 356, 134–142.
12. **De Vincenzi M., Stamatii A., Luchetti R., Silano M., Gasbarrini G., Silano V.** 1998. Structural specificities and significance for coeliac disease of wheat gliadin

peptides able to agglutinate or to prevent agglutination of K562 (S) cells. *Toxicology*; 127:97–106.

- 13. Di Sabatino A., Ciccocioppo R., D'Alò S., Parroni R., Millimaggi M., Cifone M.G., Corazza G.R.** 2001. Intraepithelial and lamina propria lymphocytes show distinct patterns of apoptosis whereas both populations are active in Fas based cytotoxicity in coeliac disease. *Gut*, 49, 380–386.
- 14. Dugas B., Dugas N., Conti M., Calenda A., Pino P., Thomas Y., Mazier D., Vouldoukis I.** 2003. Wheat gliadin promotes the interleukin - 4 - induced IgE production by normal human peripheral mononuclear cells through a redox-dependent mechanism. *Cytokine* 21: 270-280.
- 15. Dolfini E., Elli L., Dasdia T. et al.** 2002. *In vitro* cytotoxic effect of bread wheat gliadin on the LoVo human adenocarcinoma cell line. *Toxicol Vitro*; 16:331–7.
- 16. Elli, L.; Dolfini, E.; Bardella, M.T.** 2003. Gliadin cytotoxicity and in vitro cell cultures. *Toxicol. Lett.*, 46, 1–8.
- 17. Ertekin V., Selimoğlu M.A., Türkan Y., Akçay F.** 2005. Serum nitric oxide levels in children with celiac disease. *J. Clin. Gastroenterol.*, 39, 782–785.
- 18. Esteve M. et al.** 2006. Spectrum of gluten - sensitive enteropathy in first-degree relatives of patients with coeliac disease: clinical relevance of lymphocytic enteritis. *Gut* 55: 1739-1745.
- 19. Ferretti G., Bacchetti T., Masciangelo S., and Saturni L.** 2012. Celiac Disease, Inflammation and Oxidative Damage: A Nutrigenetic Approach. *Nutrients*, 4, 243-257.
- 20. Filomeni G., Rotilio G., and Ciriolo M. R.** 2002. Glutathione disulfide induces apoptosis in U937 cells by a redox-mediated p38 MAP kinase pathway. *The FASEB Journal* 17(1):64-6.
- 21. Fleckenstein B., Molberg O., Qiao S.W. et al.** Gliadin T cell epitope selection by tissue transglutaminase in celiac disease. 2002. Role of enzyme specificity and pH influence on the transamidation versus deamidation reactions. *J Biol Chem*; 277:34109–16.
- 22. Folk J.E., Finlayson J.S.** 1977. The Ne-(g-glutamyl) lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminases. *Adv Protein Chem*; 31:1– 133.
- 23. Folk J.E.** 1983. Mechanism and basis for specificity of transglutaminase catalyzed (g-glutamyl) lysine bond formation. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 54, 1–56.
- 24. Gadea J., Gumbao D., Gómez-Giménez B., Gardón J. C.** 2013. Supplementation of the thawing medium with reduced glutathione improves function of frozen-thawed goat spermatozoa. *Reprod Biol*; 13(1):24-33.

25. **Giovannini C., Sanchez M., Straface E., Scazzocchio B., Silano M., de Vincenzi M.** 2000. Induction of apoptosis in CaCo-2 cells by wheat gliadin peptides. *Toxicology*, 145, 63–71.
26. **Giovannini C., Maiuri L., de Vincenzi M.** 1994. Cytotoxic effect of prolamin-derived peptides on *in vitro* cultures of cell line Caco-2: Implications for coeliac disease. *Toxicol. In Vitro*, 9, 251–255.
27. **Giovannini C., Matarrese P., Scazzocchio B. et al.** 2003. Wheat gliadin induces apoptosis of intestinal cells via an autocrine mechanism involving Fas-Fas ligand pathway. *FEBS Lett*; 540 (1–3):117–24.
28. **Giovannini C., Lucchetti R., De Vincenzi M.** 1997. The activities of peptides ‘31–43’, ‘44–55’ and ‘56–68’ of A-gliadin on *in vitro* cultures of Caco-2 cells. *ATLA*; 25:437–43.
29. **Groschwitz K.R., Hogan S.P.** 2009. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *Clinical reviews in allergy and immunology. J Allergy Clin Immunol* 124:3–20.
30. **Heyman, M.; Menard, S.** 2009. Pathways of gliadin transport in celiac disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1165, 274–278.
31. **Högberg L., Webb C., Fälth-Magnusson K., Forslund T., Magnusson K.E., Danielsson L., Ivarsson A., Sandström O., Sundqvist T.** 2011. Children with screening-detected coeliac disease show increased levels of nitric oxide products in urine. *Acta Paediatr.*, 100, 1023–1027.
32. **Hozyasz K.K., Chelchowska M., Laskowska-Klita T.** 2003. Vitamin E levels in patients with celiac disease. *Med. Wieku Rozwoj.*, 7, 593–604.
33. **Husby S., Koletzko S., Korponay-Szabó I. R. et al.** 2012. European society for pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, vol. 54, no. 1, pp. 136–160.
34. **Hwang C., Sinskey A.J., Lodish H.F.** 1992. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* 257: 1496-1502.
35. **Hwang D.** 1989. Essential fatty acids and the immune response. *FASEB J* 3, 2052.
36. **Kagnoff M.F.** 2005. Overview and pathogenesis of celiac disease. *Gastroenterology*, 128, 10–18.
37. **Kelsall B. L., Leon, F.** 2005. Involvement of intestinal dendritic cells in oral tolerance, immunity to pathogens, and inflammatory bowel disease. *Immunol. Rev.* 206, 132-148

38. Kim H.J., Vosseler C.A., Weber P.C., Erl W. 2005. Docosahexaenoic acid induces apoptosis in proliferating human endothelial cells. *J Cell Physiol* **204**:881-888.
39. Koning F., Schuppan D., Cerf-Bensussan N., Sollid L.M. 2005. Pathomechanisms in celiac disease. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*19, 373–387.
40. Kosower N.S. and Kosower E.M. 1978. The glutathione status of cells. *Int Rev Cytol* 54: 109-160.
41. Lauret E., Rodrigo L. 2013. Celiac Disease and Autoimmune-Associated Conditions. *Biomed Res Int*, 2013:127589.
42. Liu C. S., Glahn R. P., Liu, R. H. 2004. Assessment of carotenoid bioavailability of whole foods using a Caco-2 cell culture model coupled with an *in vitro* digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4330–4337.
43. Luciani A., Vilella V.R., Vasaturo A., Giardino I., Pettoello-Mantovani M., Guido S., Cexus O.N., Peake N., Londei M., Quarantino S., *et al.* 2010. Lysosomal accumulation of gliadin p31–43 peptide induces oxidative stress and tissue transglutaminase-mediated PPARgamma downregulation in intestinal epithelial cells and coeliac mucosa. *Gut*, 59, 311–319.
44. Ma D.W.L., Seo J, Switzer K.C., Fan Y.Y., McMurray D.N., Lupton J.R., Chapkin R.S. 2004. N-3 PUFA and membrane microdomains: a new frontier in bioactive lipid research. *J Nutr Biochem* 15:700–706.
45. Mårtensson J., Jain A., Meister A. 1990. Glutathione is required for intestinal function. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1715-1719.
46. Meresse B., Ripoche J., Heyman M., and Cerf-Bensussan N. 2009 .Celiac disease: from oral tolerance to intestinal inflammation, autoimmunity and lymphomagenesis. *Mucosal Immunology*,vol. 2, no. 1, pp. 8–23.
47. Maiuri L., Ciacci C., Ricciardelli I., Vacca L., Raia V., Auricchio S., Picard J., Osman M., Quarantino S., Londei M. 2003. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in celiac disease. *Lancet*, 362, 30–37.
48. Maiuri L., Ciacci C., Auricchio S., Brown V., Quarantino S., and Londei M. 2000. Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology*, vol. 119, no. 4, pp. 996–1006.
49. Maiuri L., Ciacci C., Raia V. M. *et al.* 2001. FAS engagement drives apoptosis of enterocytes of coeliac patients. *Gut*;48:418–24.
50. Maiuri M.C., De Stefano D., Mele G., Iovine B., Bevilacqua M.A., Greco L., Auricchio S., Carnuccio R. 2003. Gliadin increases iNOS gene expression in interferon-gamma-stimulated RAW 264.7 cells through a mechanism involving NF-kappa B. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 368: 63-71.

51. **Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C and Giovannini C.** 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 16: 577-586.
52. **Nanayakkara M., Lania G., Maglio M., Discepolo V., Sarno M., Gaito A., Troncone R., Auricchio S., Auricchio R., Barone M.V.** 2013. An undigested gliadin peptide activates innate immunity and proliferative signaling in enterocytes: the role in celiac disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, 98, 1123–1135.
53. **Nikulina M., Habich C., Floh B., Scott F., Kolb H.** 2004. Wheat gluten causes dendritic cell maturation and chemokine secretion. *J Immunol*; 173:1925–33.
54. **Pagliari D., Frosali S., Landolfi R. et al.** 2013. The role of IL-15 in human cancer: friend or foe? *International Trends in Immunity*, vol. 1, no. 2, pp. 35–42.
55. **Pender S.L.F., Lionetti P., Murch S.H., Wathan N., MacDonald T.T.** 1996. Proteolytic degradation of intestinal mucosa extracellular matrix after lamina propria T cell activation. *Gut*, 39, 284–290.
56. **Purasiri P., Mckechnie A., Heys S.D., Eremin O.** 1997. Modulation *in vitro* of human natural cytotoxicity, lymphocyte proliferative response to mitogens and cytokine production by essential fatty acids. *Immunology*; 92(2):166-72.
57. **Qiao S.W., Bergseng E., Molberg Ø., Xia J., Fleckenstein B., Khosla C., Sollid L.M.** 2004. Antigen presentation to celiac lesion-derived T cells of a 33-mer gliadin peptide naturally formed by gastrointestinal digestion. *J Immunol*; 173:1757-1762;
58. **Rivabene R., Mancini E., De Vincenzi M.** 1999. *In vitro* cytotoxic effect of wheat gliadin-derived peptides on the caco-2 intestinal cell line is associated with intracellular oxidative imbalance: implications for coeliac disease. *biochim biophys acta* 1453: 152-160.
59. **Rothem L., Hartman C., Dahan A., Lachter J., Eliakim R., Shamir R.** 2007. Paraoxonases are associated with intestinal inflammatory diseases and intracellularly localized to the endoplasmic reticulum. *Free Radic. Biol. Med.*, 43, 730–739.
60. **Salvati V. M., Troncone R., Bajaj-Elliott M. et al.** 2001. Keratinocyte growth factor and coeliac disease. *Gut*, vol. 49, no. 2, pp. 176– 181.
61. **Sansonetti P.J.** 2004. War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol* 4:953–964.
62. **Satsangi J., Chapman R. W. G., Haldar N. et al.** 2001. A functional polymorphism of the stromelysin gene (MMP-3) influences susceptibility to primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology*, vol. 121, no. 1, pp. 124–130.
63. **Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T., Hume D.A.** 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 75(2):163-89.

64. **Schumann M., Richter J.F., Wedell I. Moos V., Zimmermann-Kordmann M., Schneider T., Daum S., Zeitz M., Fromm M., Schulzke J.D.** 2008. Mechanisms of epithelial translocation of the α 2-gliadin-33mer in coeliac sprue. *Gut*, 57, 747–754.
65. **Shoji H., Franke C., Demmelair H., Koletzko B.** 2009. Effect of docosahexaenoic acid on oxidative stress in placental trophoblast cells. *Early Hum Dev*;85: 433e7.
66. **Silk D.B., Grimble G.K., Rees R.G.** 1985. Protein digestion and amino acid and peptide absorption. *Proc Nutr Soc.*;44(1):63–72.
67. **Shan L., Ø. Molberg I., Parrot F., Hausch F., Filiz G., Gray M., Sollid L. M., and Khosla C.** 2002. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* 297:2275.
68. **Shibahara T., Wilcox J.N., Couse T., and Madara J.L.** 2001. Characterization of epithelial chemoattractants for human intestinal intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterol* 120, 60-70.
69. **Sollid L. M.** 2002. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat. Rev. Immunol.* 2:647.
70. **Spiteller G.** 2007. The important role of lipid peroxidation processes in aging and age dependent diseases. *Mol Biotechnol* 37: 5-12.
71. **Stohs S. J.** 1995. The role of free radicals in toxicity and disease. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 6, 205–228.
72. **Stojiljković V., Pejić S., Kasapović J., Gavrilović I. , Stojiljković S., Nikolić D., 4 and Pajović S. B.** 2012. Glutathione redox cycle in small intestinal mucosa and peripheral blood of pediatric celiac disease patients *An acad bras cienc. mar*;84(1).
73. **Stojiljković V., Todorović A., Pejić, S., Kasapović J., Saicić Z.S., Radlović N., Pajović S.B.** 2009. Antioxidant status and lipid peroxidation in small intestinal mucosa of children with celiac disease. *Clin. Biochem.*, 42, 1431–1437.
74. **Szaflarska-Poplawska A., Siomek A., Czerwionka-Szaflarska M., Gackowski D., Rózański R., Guz J., Szpila A., Zarakowska E., Olinski R.** 2010. Oxidatively damaged DNA/oxidative stress in children with celiac disease. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 19, 1960–1965.
75. **Urano S., Yano K., Matsuo M.** 1988. Membrane-stabilizing effect of vitamin E: effect of α -tocopherol and its model compounds on the fluidity of lecithin liposomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150 469-475.
76. **Van Heel D.A., West J.** 2006. Recent advances in coeliac disease. *Gut* , 36, 864–874.

77. **Van de Wal Y., Kooy Y., Van Veelen P., Peña S., Mearin L., et al.** 1998. Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *J. Immunol.*;161(4):1585–1588.
78. **Veldhoen M., Brucklacher-Waldert V.** 2012. Dietary influences on intestinal immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 12, 696–708.
79. **Vincentini O., Quaranta M.G., Viora M., Agostoni C., Silano M.** Docosahexaenoic acid modulates *in vitro* the inflammation of celiac disease in intestinal epithelial cells via the inhibition of cPLA2. *Clin. Nutr.* **2011**, 30, 541–546.
80. **Virgili F., Santini M.P., Canali R., Polakowska R.R., Haake A., Perozzi G.** 1998. Bcl-2 overexpression in the HaCaT cell line is associated with a different membrane fatty acid composition and sensitivity to oxidative stress, *Free Radic. Biol. Med.* 24, 93-101.
81. **Vivas S., Santolaria S.** 2010. Enfermedad celíaca. En: Ponce J, Castells A, Gomollon F, editores. Tratamiento de las Enfermedades Gastroenterológicas. 3.a ed. Barcelona: Asociación Española de Gastroenterología; p. 265---78.
82. **Wieser H.; Koehler P.** 2008. The biochemical basis of celiac disease. *Cereal Chem.* 85, 1–13
83. **Wijeratne S.S., Cuppett S, L.,** 2006. Lipid hydroperoxide induced oxidative stress damage and antioxidant enzyme response in Caco-2 human colon cells. *J Agric Food Chem* 54: 4476-4481..
84. **Zapata-Gonzalez F., Rueda F., Petriz J., Domingo P., Villarroya F., Diaz-Delfin J., de Madariaga M.A., Domingo J.C.** 2008. Human dendritic cell activities are modulated by the omega-3 fatty acid, docosahexaenoic acid, mainly through PPAR(gamma):RXR heterodimers: Comparison with other polyunsaturated fatty acids. *J. Leukoc. Biol.*, 84, 1172–1182.
85. **Zimmermann C., Rudloff S., Lochnit G., Arampatzi S.** 2014. Epithelial Transport of Immunogenic and Toxic Gliadin Peptides In Vitro. *PLoS One* 9(11):e113932.
86. **Zimmer K.P., Fischer I., Mothes T., Weissen-Plenz G., Schmitz M., Wieser H., Büning, J., Lerch M.M., Ciclitira P.C., Weber P. et al.** 2010. Endocytotic segregation of gliadin peptide 31–49 in enterocytes. *Gut*, 59, 300–310.

10. RESUMEN DE ASIGNATURAS

Seguridad en el laboratorio y experimentación animal (Créditos ECTS: 4.0)

Este curso teórico-práctico se encuentra ubicado en el módulo de Fundamentos de Biología Molecular, Celular y Genética, en el que se abordan los principios básicos de la titulación con la intención de lograr alcanzar las competencias que se estiman como el pilar de futuras asignaturas como es el conocimiento de los riesgos químicos, físicos y biológicos a los que nos podemos enfrentar durante el trabajo en un laboratorio, el conocimiento de la legislación específica vigente que repercute en el trabajo en el mismo, el diseño de estrategias experimentales y experimentos de investigación y, por último, la organización del laboratorio, control de calidad y riesgos laborales. Los contenidos abordados en este curso se han visto reforzados por la impartición de una serie de charlas llevadas a cabo por profesionales de diferentes universidades, mostrándonos la importancia de adquirir las competencias anteriormente mencionadas y su aplicación desde los conceptos teóricos aprendidos durante el curso.

Proteómica y dinámica de proteínas (Créditos ECTS: 4.0)

Este curso, orientado hacia una formación teórica-práctica se encuentra dentro del módulo de Fundamentos de Biología Molecular, Celular y Genética en el cual se estudian los procesos de plegamiento, recambio, degradación, maduración y transporte de proteínas y , a continuación, los principios, metodología y aplicaciones de la proteómica. Las técnicas de caracterización de proteínas y proteómica son herramientas fundamentales utilizadas en la investigación básica, biotecnológica y biomédica por lo que, en este curso, se trabajaron aspectos en los que las competencias finales se tradujeron en aprender a manejar bases de datos de biología molecular y darle un uso en tareas de investigación, conocer los fundamentos de la dinámica de proteínas y proteómica, diseñar y planificar experimentos de investigación así como diseñar estrategias experimentales alternativas, capacidad de manejar bibliografía y documentación científica en inglés así como desarrollar una exposición escrita y oral de proyectos de investigación y sus resultados . Estas nociones teórico-prácticas se han visto complementadas con una serie de charlas que han ahondado en el enfoque biotecnológico de la proteómica.

Regulación de la expresión génica y desarrollo (Créditos ECTS: 4.0)

Este curso se engloba dentro del módulo de Fundamentos de Biología Molecular Celular y Genética en el que se realizan lecciones teórico-prácticas que pretenden profundizar en los conocimientos acerca de la regulación de la expresión de genes, tanto en

procesos concretos como a lo largo del desarrollo de los organismos para lo cual se establecieron las competencias de manejar y extraer información de las bases de datos de biología molecular, saber manejar herramientas de Bioinformática, conocer los mecanismos de regulación génica, saber ejecutar experimentos e interpretar sus resultados y, por último, competencias generales como es el manejo de bibliografía y documentación científica y el desarrollo de una capacidad crítica y argumentación escrita y oral. Se abordó no sólo el estudio de la regulación específica de determinados genes, sino también el papel que el DNA repetitivo y los elementos móviles juegan en la regulación de la expresión génica. Se profundizó igualmente en el uso de las técnicas de análisis y medida de la expresión génica. Para asentar los aspectos más importantes del curso se realizaron seminarios de búsqueda de información en la web y los conocimientos se vieron cumplimentados con una serie de charlas que ayudaron a entender los conceptos tratados en el curso.

Microscopía Avanzada y Análisis de Imagen (Créditos ECTS: 4.0)

Este curso teórico-práctico está encuadrado dentro del módulo Técnicas de Biología Molecular y Celular, siendo sus contenidos referentes al conocimiento y al manejo de diferentes tipos de microscopios, así como la gestión y trabajo con imágenes digitalizadas son herramientas de uso habitual en una gran mayoría de líneas de investigación biomédicas mediante los cuales se obtuvieron las competencias de saber usar el microscopio, realizar la preparación previa de muestras biológicas para su análisis así como el uso de herramientas de reconstrucción fotográfica en microscopía óptica, tanto en 2D como en 3D, diseñar y planificar experimentos de investigación, diseñar estrategias experimentales alternativas, capacidad de manejar bibliografía y documentación científica en inglés así como desarrollar una exposición escrita y oral de proyectos de investigación y sus resultados. Es de interés por tanto para todo aquel que necesite utilizar estos aparatos, conocer perfectamente sus tipos, prestaciones y manejo. El objetivo fundamental que se plantea este curso es el de conocer los fundamentos y manejo de los distintos tipos de microscopios y su aplicación en los diferentes campos de la investigación, así como los métodos más usuales de captura, gestión y tratamiento de las imágenes obtenidas. Los conocimientos se vieron asentados con la realización de un trabajo monográfico que contuviera una aplicación biotecnológica real de la microscopía y de las técnicas histológicas de análisis.

Cultivos celulares, diferenciación y terapia celular (Créditos ECTS: 4.0)

Este curso, incluido en el módulo de Biología Molecular, Celular y la Genética pretende que se adquieran conocimientos de las técnicas básicas de cultivos celulares que más se manejan en el ámbito de la biotecnología y biomedicina con el consiguiente alcance

de las competencias tales como el conocimiento de los fundamentos y el manejo de cultivos celulares, el uso del citómetro de flujo, el estudio de las técnicas relacionadas con cultivos de células animales, así como sus aplicaciones en el campo de la investigación biomédica y biotecnológica, el conocimiento de la importancia del uso de células cultivadas en investigación, las ventajas y desventajas de los cultivos celulares, la utilidad clínica e industria y el conocimiento de los procesos de diferenciación "*in vitro*" de células madre embrionarias. Para asentar todos los conocimientos adquiridos durante las clases teórico-prácticas se realizaron una serie de análisis estadísticos de los datos obtenidos así como unas conclusiones y argumentación de los resultados.

Ingeniería genética avanzada (Créditos ECTS: 4.0)

Este curso, dotado de una cualificación teórico-práctica, está ubicado en el módulo de Técnicas de Biología Molecular, Celular y Genética, en el que se pretende profundizar en la metodología que permite modificar genéticamente células, organismos diversos o plantas y mediante el cual se adquirirán las competencias de realizar en el laboratorio clonación de genes en vectores de expresión, saber aplicar la ingeniería genética a la mejora animal y vegetal, conocer la tecnología más moderna de genotipación y secuenciación y el desarrollo de la capacidad de manejar bibliografía y documentación científica en inglés así como desarrollar una exposición escrita y oral de proyectos de investigación y sus resultados. Para ello, se trató la base conceptual del conjunto de técnicas, se abordó su aplicación a la clonación y la obtención de organismos modificados genéticamente y se dio a conocer sus aplicaciones en biotecnología y biomedicina. Finalmente, se analizó las implicaciones éticas de estas metodologías, y se analizó la normativa nacional y comunitaria vigente.

Biotecnología diagnóstica (Créditos ECTS: 4.0)

Con este curso, localizado en el modulo de Biología Molecular, Celular y la Genética, se pretendió proporcionar una visión global sobre técnicas moleculares de última generación aplicadas al diagnóstico, permitiéndonos la elección de aquellas más adecuadas en cada situación particular en el que, además se pretendió profundizar en la aplicabilidad y utilidad de los métodos de Citología e Histología molecular, ampliamente difundidos y aceptados en disciplinas biológicas y biomédicas. El abordaje desde una visión teórico-práctica de los contenidos de este curso nos permitió adquirir una serie de competencias tales como el conocimiento de las bases moleculares de la enfermedad y el cómo realizar el diagnóstico desde su base molecular y el tratamiento, el saber diseñar y planificar experimentos de investigación así como estrategias alternativas y el consecuente manejo de bibliografía y documentación científica, desarrollando así una capacidad crítica argumentativa reflejada en una exposición escrita y oral de proyectos de investigación y sus

resultados. Los conocimientos adquiridos se verían asentados con la participación de una serie de conferenciantes expertos en biotecnología diagnóstica, vinculados con el mundo empresarial y hospitalario.

Citogenética molecular y clínica (Créditos ECTS: 4.0)

Este curso teórico-práctico se encuentra dentro del modulo de Biomedicina y nos dotó del conocimiento sobre la estructura de los cromosomas y las enfermedades relacionadas con una estructura anómala. Así pues, las competencias que adquirimos con la realización de este curso se basan en saber realizar un diagnostico y consejo genético, entender los fundamentos y aplicaciones de las técnicas de bandeo cromosómico, aprender a realizar las técnicas citogenéticas más usuales y ser capaz de hacer un cariotipo humano y diagnosticar las alteraciones cromosómicas más frecuentes mediante sesiones académicas teórico-prácticas, desarrolladas en el laboratorio, en las que se aplicaron las diferentes técnicas de citogenética y citogenética molecular comentadas en la parte teórica del curso. Una visión clínica de este campo de la biología fue puesto de manifiesto con una conferencia sobre el diagnostico genético prenatal.

Estrés celular (Créditos ECTS: 4.0)

El curso teórico-práctico de Estrés celular se encuentra englobado dentro del módulo de Biomedicina donde se nos impartieron las nociones de las funciones biológicas de las especies reactivas del nitrógeno (RNS) y del oxígeno (ROS), su reactividad bioquímica y enzimología, la producción de radicales de nitrógeno y oxígeno en situaciones de estrés, la metodología para la detección de estos radicales libres y la realización de diseños experimentales que permitan evidenciar diferentes comportamientos moleculares asociados a fenómenos de estrés celular. Las competencias que adquirimos en lo relativo al curso se vieron complementadas con unas sesiones prácticas en las que se realizó la determinación de la respuesta de la actividad de sistemas antioxidantes frente a situaciones de estrés en tejidos animales y la determinación de la actividad oxido nítrico sintasa de tejidos animales mediante quimioluminiscencia de ozono con la consecuente realización de un cuaderno recogiendo los resultados y discusión de los resultados. Los contenidos impartidos en el curso se vieron puestos de manifiesto en la práctica científica con una serie de charlas abordadas por profesionales de este campo.

Patología molecular y celular (Créditos ECTS: 4.0)

El programa de este curso teórico-práctico, ubicado en el módulo de Biomedicina responde al objetivo de ofrecer la posibilidad de formación a nivel de la biología molecular mediante el conocimiento del origen de ciertas enfermedades cuya etiología sería difícil de

comprender mediante escrutinio fenomenológico. Por tanto, este curso, pretendió iniciarnos en el conocimiento de la etiología molecular de las enfermedades y en la aplicación de dicho conocimiento al diagnóstico y tratamiento de las mismas para alcanzar las competencias tales como conocer en profundidad las bases moleculares de la enfermedad y la aplicación de la biología molecular en el diagnóstico y tratamiento, conocer los principios de la terapia génica. Además, para la completa asimilación de tales competencias y, para desarrollar una capacidad crítica y argumentativa así como saber utilizar bibliografía y documentación y diferentes bases de datos, se llevó a cabo análisis de trabajos de investigación y la defensa de sus resultados. Para la completa comprensión y el enfoque clínico de este curso se nos impartió una charla donde se nos dio un enfoque clínico de la terapia del cáncer.

Biología molecular y celular del envejecimiento (Créditos ECTS: 4.0)

Este curso, ubicado en el módulo de Biomedicina, constituye uno de los campos científicos más dinámicos y creativos con un fuerte impacto social y económico, especialmente en su relación con la Medicina y la Biotecnología. El curso está diseñado para proporcionarnos una formación avanzada y una experiencia práctica de los procesos y mecanismos moleculares del envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas así como potenciales terapias celulares y farmacológicas para su tratamiento, trabajando aspectos en los que las competencias finales se tradujeron en: aprender a manejar bases de datos de biología molecular y darle un uso en tareas de investigación, conocer en profundidad las bases moleculares de la enfermedad y la aplicación de la biología molecular en el diagnóstico y tratamiento, conocer los principios de la terapia génica, diseñar y planificar experimentos de investigación así como diseñar estrategias experimentales alternativas, capacidad de manejar bibliografía y documentación científica en inglés así como desarrollar una exposición escrita y oral de proyectos de investigación y sus resultados. Los contenidos impartidos nos proporcionaron una formación avanzada y una experiencia práctica de los procesos y mecanismos moleculares del envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas, así como permitirnos abordar las terapias celulares y farmacológicas para su tratamiento, viéndose cumplimentada esta formación con una serie de charlas.

Neuroendocrinología (Créditos ECTS: 4.0)

Con este curso, el último de los impartidos en el máster, ubicado en el módulo de Biomedicina se pretendió formarnos en las bases funcionales de los dos principales sistemas de comunicación interna: los sistemas nervioso y endocrino y cómo interactúan en el mantenimiento de la homeostasis. Con ello, adquirimos conocimientos necesarios de la fisiopatología, así como de las técnicas en investigación neuroendocrina que sean de utilidad para fines académicos y profesionales, alcanzando ,a su vez una serie de

competencias tales como conocer los sistemas de segundos mensajeros intracelulares, conocer los mecanismos neuroendocrinológicos, capacidad de manejar bibliografía y documentación científica en inglés así como desarrollar una exposición escrita y oral de proyectos de investigación y sus resultados. Nuestros conocimientos se vieron apoyados y aplicados con una charla que trataba varios aspectos tratados durante el curso en materia de enfermedades neurodegenerativas.

11. CURRICULUM VITAE

DATOS PERSONALES



Nombre y Apellidos: Candelaria Ponce de León Collado

Dirección: C/Ángel Romero Romero, nº2, 4ºT.

Población: Bailen (Jaén)

Teléfono: 953672040

Móvil: 609865585

E-mail: capoleco@gmail.com

Fecha Nacimiento: 3/05/1992

FORMACIÓN ACADÉMICA

Graduada en Biología (2010-2014).Universidad de Jaén.

- Rama biología molecular.

Título de Bachiller (2008-2010). Ies. María Bellido (Bailén, Jaén).

- Bachiller de ciencias.

Título de E.S.O (2003-2008).Colegio Sagrado Corazón de Jesús (Bailén, Jaén)

FORMACIÓN COMPLEMENTARIA:

- MÁSTER EN BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA (2014-2015).UNIVERSIDAD DE JAÉN

EXPERIENCIA

No procede.

COMPETENCIAS INFORMÁTICAS

- Microsoft Office a nivel usuario avanzado.
- Manejo de programas de análisis como Image J y Photoshop así como de análisis estadístico como Statgraphic y SPSS y matemático como Wolfram Mathematica.
- Control del sistema de análisis de resultados citométricos Flowing software 2.
- Domino de las bases de datos científicas.

IDIOMAS:

INGLÉS

PRELIMINARY ENGLISH TEST CERTIFICATE (B1)
