



Universidad de Jaén

Escuela de Doctorado

TESIS DOCTORAL

•

**PUNTOS DE CONTROL INMUNITARIO: RECIENTES AVANCES Y POTENCIALES
BIOMARCADORES EN LA ENFERMEDAD CELÍACA**

PRESENTADA POR:

PONCE DE LEÓN COLLADO, CANDELARIA

DIRIGIDA POR:

TORRES LÓPEZ, M^a ISABEL



Universidad de Jaén

Facultad de Ciencias Experimentales
Departamento de Biología Experimental
Área de Biología Celular

La Dra. María Isabel Torres López, Catedrática de Universidad de la Universidad de Jaén certifica que la Tesis Doctoral titulada: "**Puntos de control inmunitario: recientes avances y potenciales biomarcadores en la enfermedad celíaca**", que presenta Candelaria Ponce de León Collado para optar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo su dirección, reuniendo, a su juicio, los requisitos exigidos para esta presentación.

Jaén, Octubre de 2023

Directora/Tutora
Dra. María Isabel Torres López

Doctoranda
Candelaria Ponce de León Collado

Memoria presentada por la graduada
Candelaria Ponce de León Collado
Octubre 2023

AGRADECIMIENTOS

A lo largo del desarrollo de la presente Tesis Doctoral, muchas personas se han cruzado en mi camino y lo han enriquecido, pero no sólo académicamente, sino que también han hecho de este recorrido, una experiencia más constructiva para mí como persona. Es por eso que me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas ellas.

*A mi directora y tutora de tesis, **M^a Isabel Torres López** por su dedicación y paciencia. Mis agradecimientos van más allá de la simple dirección de esta tesis, **Maribel**. Gracias por confiar en mí desde el principio unos buenos años atrás. Por transmitirme tu experiencia, tu orientación y el apoyo que ha ayudado a que esta tesis sea hoy una realidad.*

*A la **Universidad de Jaén** por proporcionarme el lugar y la oportunidad para desarrollar la tesis aquí expuesta en sus instalaciones.*

*Al departamento de **Biología Experimental** y, en especial, a las **Áreas de Genética y Biología celular**. Al coordinador del programa de Doctorado de Biología Molecular y Celular, **Diego** por su incesante apoyo, interés en la formación y transmisión del conocimiento con sus Jornadas Doctorales y, sobretodo, por su disponibilidad en todo momento. A **Pedro** por acogerme en el laboratorio de genética como una más aunque eso podía cambiar según el día, la hora y el humor. Por estar siempre solícito y ser una fuente de conocimiento para ayudarme a mejorar y optimizar mi trabajo. No me olvido tampoco de la infinita paciencia que has tenido conmigo. A **Antonio Sánchez** por transmitir esa alegría que desprendía por el laboratorio de genética y por no rendirte en encontrar la respuesta a la pregunta de cuándo leía la tesis de una vez, todo llega.*

*Al cuerpo de técnicos de laboratorio y, en especial, a **Juani** por orientarme y enseñarme en cuestiones que ella manejaba como nadie de forma tan amable y atenta.*

*A todas mis compañeras y compañeros de grupo: **Areli, Pablo, Jesús, Eli, José Manuel** y **Diogo** por las horas y experiencias compartidas en el laboratorio aprendiendo y como no, riendo juntos.*

*A **Carlos** por los años de largas charlas sobre videojuegos, el ánimo y apoyo mutuo que nos dábamos siempre que nos cruzábamos por el laboratorio de biología celular. A **Laura** por aquellos ratos en la sala de becarios riéndonos por no llorar de nuestros infortunios y días*

mejorables, afrontándolos con una sonrisa. A **M^a Carmen** por su amabilidad y siempre actitud atenta que hacía los días duros más agradables.

Por último, gracias a mis **padres y hermanos** por su paciencia, pues convivir con una doctoranda no es tarea sencilla. Gracias a su ánimo y esfuerzo me han permitido conseguir hoy un logro más. Gracias por inculcar en mí los valores que me han hecho llegar hasta aquí y por estar siempre a mi lado, apoyándome incondicionalmente aún en los momentos duros, que no han sido pocos en estos años.

ABREVIATURAS

AIC	Criterio de información de Akaike
Anti-AGA	Anticuerpo anti-gliadina
Anti-EmA	Anticuerpo anti-endomisio
Anti-PDG	Anticuerpo anti-péptidos desaminados de gliadina
Anti-TG2	Anticuerpo anti-transglutaminasa tisular 2
APC	Célula presentadora de antígenos
CEI	Célula epitelial intestinal
CTLA-4	Antígeno 4 del linfocito T citotóxico
DC	Célula dendrítica
GWAS	Estudios de asociación de todo el genoma
EC	Enfermedad celíaca
ELISA	Enzimoinmunoanálisis de adsorción
ESPGHAN	Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica
FT	Factor de transcripción
IDO	Indoleamina 2, 3-dioxigenasa
IE	Índice de estimulación
IFN-γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
iT_{REG}	Célula T reguladora "inducida"
LIE	Linfocito intraepitelial
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MIP-4	Proteína inflamatoria de macrófagos-4

nT_{REG}	Célula T reguladora “natural”
OR	Odds Ratio
PBMC	Célula mononuclear de sangre periférica
PD-1	Molécula de muerte celular programada
PD-L1/2	Ligando 1/2 de muerte celular programada
PHA	Fitohemaglutinina
RFLP	Fragmentos de restricción de longitud polimórfica
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
TCR	Receptor de células T
Teff	Célula T efectora
Th	Célula T helper o auxiliar
T_{REG}	Célula T reguladora
tTG/TG-2	Transglutaminasa tisular (tipo 2)

ÍNDICE

CAPÍTULO I – INTRODUCCIÓN

1. Respuesta inmune.....	1
2. Mecanismos de tolerancia inmunológica.....	2
3. Regulación de la inmunidad.....	4
3.1. Puntos de control inmunitario.....	5
<i>PD1:PD-L1/2</i>	6
<i>ELAFIN</i>	8
<i>CD200:CD200R</i>	10
4. Desorden autoinmune.....	11
5. Enfermedad celíaca.....	12
5.1. Patogenia.....	12
5.2. Epidemiología.....	15
5.3. Diagnóstico.....	16

CAPÍTULO II - OBJETIVOS.....20

CAPÍTULO III - RESUMEN DE LOS RESULTADOS

<i>PD1:PD-L1/2</i>	22
<i>ELAFIN</i>	25
<i>CD200:CD200R</i>	26

CAPÍTULO IV – DISCUSIÓN.....29

CAPÍTULO V – CONCLUSIONES.....38

BIBLIOGRAFÍA.....41

APORTACIONES CIENTÍFICAS

- Artículos científicos con contribuciones directas a la Tesis Doctoral.

Artículo 1: Dysregulation of the PD-1/PD-L1 pathway contributes to the pathogenesis of celiac disease.....	60
---	----

Artículo 2: Significance of PD-1 alternative splicing in celiac disease as a novel source for diagnostic and therapeutic target.....	61
Artículo 3: Expression of Elafin and CD200 as immune checkpoint molecules involved in celiac disease.....	62
• Artículos científicos relacionados con la cohorte de la Tesis Doctoral.	
Artículo 4: Physiology and Pathology of Immune Dysregulation: Regulatory T Cells and Anergy.....	63
Artículo 5: Celiac Disease Autoimmunity.....	64
ANEXOS	67

CAPÍTULO I - INTRODUCCIÓN

1. RESPUESTA INMUNE

El sistema inmune, encargado de la protección contra agentes infecciosos así como de la inmunovigilancia, no solo está involucrado en la defensa de cualquier agente externo (antígeno) considerado como extraño, sino también se encarga del reconocimiento de agentes internos (autoantígenos) como propios. Esto implica un complejo proceso de presentación y reconocimiento que permite el control, regulación y selección del sistema inmune para aceptar o atacar los diferentes agentes que detecta.

Los mecanismos que permiten al sistema inmune actuar ante el reconocimiento de agentes considerados como dañinos o tóxicos pueden ser diferenciados en: (i) respuesta inmune innata, que es la que reconoce patrones moleculares compartidos que no están presentes en el hospedador y (ii) respuesta adaptativa, que actúa al detectar un agente extraño que previamente ha sido reconocido por la innata, evitando las amenazas de patógenos extraños de forma rápida y específica.

De este modo, el sistema inmunitario presenta un mecanismo de defensa mediante efectores muy potentes que hace que sea fundamental el desarrollo de una capacidad de selección de la respuesta o tolerancia inmunológica para que pueda evitar tratar componentes propios del huésped como extraños. Mediante la tolerancia inmunológica (Matzinger, 1994) se pueden dar dos escenarios: que el antígeno sea aceptado como propio (antígeno tolerógeno), dando así lugar a la autotolerancia o que genere una respuesta defensiva (antígeno inmunógeno) (Jadue y González, 2012).

Un componente de gran relevancia del sistema inmune y vital para su respuesta, las células T, han sido reconocidos por su valioso papel en la detección de antígenos extraños. También se encuentran implicados en la conservación de la tolerancia ya que son los que identifican y diferencian las estructuras propias del huésped, evitando la propagación de la respuesta contra este, manteniendo la integridad de los autoantígenos.

Existe una gran variedad poblaciones y tipos de células T. Estas pueden discriminarse basándose en su funcionalidad, marcadores extracelulares, factores de transcripción, perfil de citoquinas y estado de activación (Fig.1) derivando todas ellas de las células T naïve (nativas) (Mousset *et al.*, 2019).

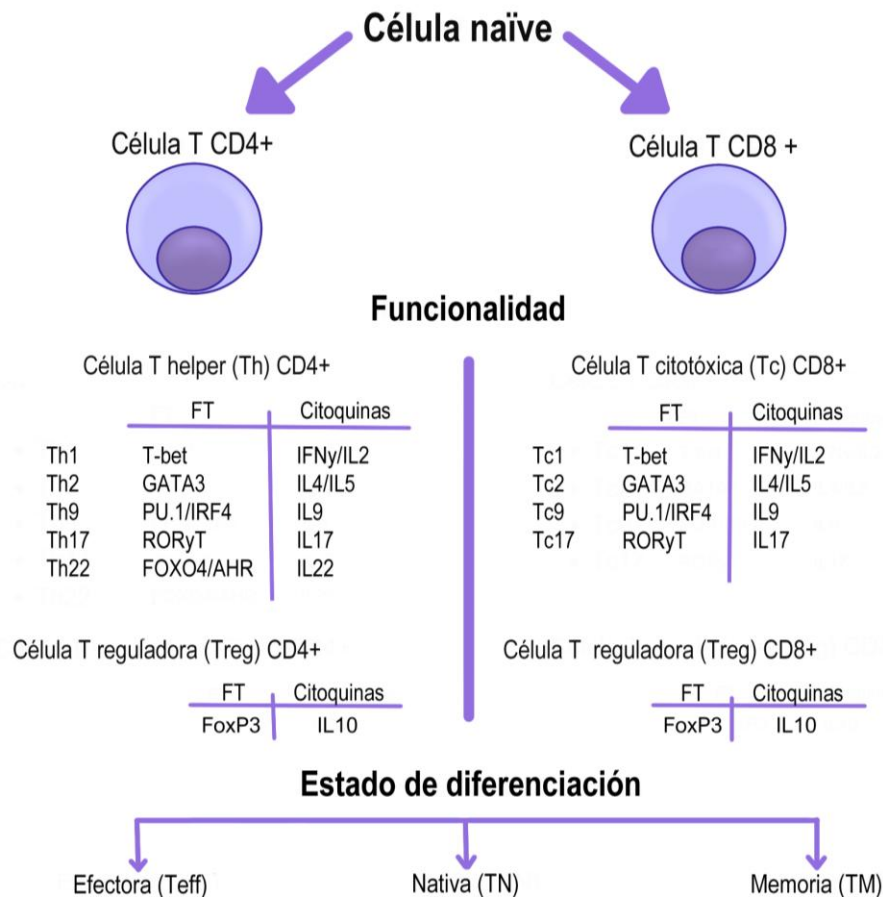


Figura 1. Esquema resumen de las diferentes poblaciones de células T previa diferenciación. FT: Factor de transcripción (Elaborado a partir de Mousset *et al.*, 2019).

2. MECANISMOS DE TOLERANCIA INMUNOLÓGICA

Una de las causas de los problemas que genera la autoinmunidad en el sistema inmunitario son las células T autoreactivas que atacan al huésped (Sakaguchi y Sakaguchi, 1990; Seddon y Mason, 1999) aunque la mayoría son inmaduras y son eliminadas por selección negativa en el timo mediante mecanismos de tolerancia central (Sakaguchi *et al.*, 1995) o son controladas por mecanismos de tolerancia periférica como es la inducida principalmente por las células T reguladoras (Tregs) (Sakaguchi *et al.*, 1995) y la anergia de las células T (Jenkins y Schwartz, 1987).

Las T_{REGS} poseen un rol fundamental en el mantenimiento de la homeostasis y tolerancia inmune (Sakaguchi, 2004) en aras de limitar las respuestas inflamatorias exacerbadas que desencadenan en múltiples desordenes de origen sistémico. La alteración de su actividad o función degenera en el desarrollo de la autoinmunidad y, de forma generalizada, en la

desregulación del sistema inmune. Su actividad abarca desde supresión de respuestas inflamatorias en las superficies mucosas expuestas a alérgenos (Curotto de Lafaille *et al.*, 2010) a infecciones patogénicas (Belkaid y Tarbell, 2009).

La población de las Tregs presentan diferentes fenotipos representados por diferentes marcadores de superficie y mecanismos de acción aunque todas se caracterizan por la expresión del factor de transcripción controlador del desarrollo y función, FoxP3. Las Tregs se diferencian en origen en naturales o derivados del Timo (nT_{REG} o tT_{REG}) o Treg inducibles (iT_{REG} o pT_{REG}) derivados de células naïve $CD4^+$ periféricas (Curotto de Lafaille y Lafaille, 2009; Komatsu *et al.*, 2009). Mientras que los nT_{REG} son los mediadores mayoritarios de la tolerancia inmunológica y autoreconocimiento, los iT_{REG} participan en la periférica en sitios de inflamación en presencia de antígenos exógenos. (Yadav *et al.*, 2013).

Asimismo, debido a su importante papel regulador, las T_{REG} también portan en su superficie una serie de moléculas, proteínas que proporcionan señales que, en muchos casos, se encargan de inhibir, limitar y amortiguar la autoreactividad de ciertas respuestas inmunes a las que se encuentra expuesto el organismo. Dichas moléculas van desde el antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) (Walunas *et al.*, 1994) al ligando 1 de muerte programada (PD-L1) (Keir *et al.*, 2008; Francisco *et al.*, 2009) entre otros.

Otro mecanismo de control del desarrollo de la autoinmunidad e implicado en en la tolerancia inmunológica es la anergia clonal (Matzinger, 1994; Jadue y González, 2012) de las células T autoreactivas (Sprent, 1995; Salojin *et al.*, 1998; Yi *et al.*, 2009). Para que una célula T sea activada, prolifere y se diferencie, es necesaria la existencia de dos tipos de señales simultáneas, de modo que es necesario que sea inducido por una primera señal proveniente de la célula presentadora de antígeno (APC) (célula dendrítica (DC), una célula B o un macrófago) creándose un sitio de unión péptido-complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-II). Además requerirá de una segunda señal, co-estimuladora, derivada de la interacción de la molécula de superficie CD28 de la célula T con la molécula B7 del APC u otro cercano que se la proporcione. De ese modo se produciría la activación y expansión clonal normal de una célula T pero, si no se le proporciona esa señal co-estimuladora, la célula entra en un estado de anergia clonal (Schwartz, 1996). Este estado de letargo reactivo es importante para evitar una reacción de autoinmunidad, ya que un linfocito T anérgico, ante la presentación de un autoantígeno por un APC, no reacciona ante él y será autotolerante. Por lo tanto, como mecanismo para regular las

respuestas inmunes no deseadas, así como la eliminación de células T autoreactivas, las células dendríticas, células B y macrófagos juegan un papel muy importante en la delección de células T o la inducción de anergia (Steinman *et al.*, 2003; Wing y Sakaguchi, 2010).

Además, existe un estado similar a la anergia, que es el agotamiento o exhaustión de las células T, en el que ni se induce proliferación, secreción de citoquinas o lisis de células diana. Las células T agotadas provienen de células que inicialmente se diferenciaron como células T efectoras (Teff) pero pierden gradualmente su actividad debido a la estimulación continua del receptor de células T (TCR). Además, se ha encontrado que la gravedad del agotamiento y la delección de células T específicas de antígenos se correlacionan con (i) la expresión de receptores estimulantes e inhibidores, (ii) los niveles de citoquinas estimulantes y supresoras y (iii) el grado de estimulación del antígeno (Bucks *et al.*, 2009; Blackburn *et al.*, 2009). Células T CD4 + y CD8 + agotadas tienen un perfil transcripcional notablemente diferente del de las Teff y de memoria que expresan CD4 + o CD8 +, incluyendo cambios en la expresión de receptores co-estimuladores e inhibidores, así como moléculas de señalización, factores de transcripción, receptores de quimiocinas, citoquinas y genes que participan en el metabolismo. Este estado posee importancia clínica dado que los pacientes con pronósticos positivos de trastornos autoinmunitarios presentan linfocitos T agotados de forma correlacionada (Kahan *et al.*, 2015).

Por lo tanto, mientras que la anergia es un estado activo de no señalización, el agotamiento se produce en el nivel patológico por la presencia de abundantes señales inflamatorias mantenidas en el tiempo.

3. REGULACIÓN DE LA INMUNIDAD

Para que las células T autoreactivas desarrollen su actividad patógena requieren ser inducidas por las APC. No obstante, para la activación de las células T se requiere de diferentes señales como son la interacción de los autopéptidos con el complejo mayor de MHC, señales co-estimuladoras y citoquinas de las APC (Wan y Flavell, 2009; Zhang y Vignali, 2016). Es por ello necesario que se produzcan señales coinhibidoras para impedir la activación aberrante de los linfocitos T autoreactivos y así detener la respuesta inmune propia (Zhang y Vignali, 2016). Se trata de una actuación coordinada entre señales co-inhibidoras y co-estimuladoras a la hora de modular la respuesta de las células T autoreactivas (Huang *et al.*, 2019).

Las moléculas que se encargan de inhibir o estimular las respuestas inmunes se denominan puntos de control inmunitario. El descubrimiento y caracterización de cada una de las moléculas aún es minoritaria, ya que los receptores-ligandos presentan diferencias en su expresión según el estado de activación celular así como entre tejidos y células (Huang *et al.*, 2019).

3.1 Puntos De Control Inmunitario

Las enfermedades autoinmunes presentan condiciones heterogéneas que implican la ruptura de la tolerancia inmunogénica, con una consecuente activación de células inmunitarias autorreactivas (Abbas *et al.*, 2004). Los puntos de control inmunitario son un grupo de moléculas inhibitoras/estimuladoras, pares moleculares receptor - ligando que son expresados por las células del sistema inmune cuyo objetivo es mediar la progresión de la respuesta adaptativa de un organismo, particularmente el de las células T y de las APC. De ese modo, mientras que los puntos de control inmunitario estimulantes favorecen la proliferación o activación de células inmunes, los inhibidores rechazan la inmunidad, conduciendo a la supresión o muerte celular.

Para que el sistema inmunitario funcione y a la vez mantenga un control de las respuestas, se ha de conservar un complejo equilibrio entre la activación de células T mediada por receptores CD28 co-estimuladores y la inhibición mediada por CTLA-4 /IDO/ PD1/ PI3/ IL-33/ CD200 entre otros. La vía mejor estudiada, esencial para la activación y tolerancia de las células T incluye a la superfamilia de B7:CD28 / CTLA-4 (Karandikar *et al.*, 1998; Oosterwegel *et al.*, 1999; Sansom, 2000; Chambers *et al.*, 2001; Salomon y Bluestone, 2001).

Entre las proteínas que ejercen un papel modulador de la respuesta inmune y de inducción de la tolerancia inmunitaria, ya han sido descritas evidencias de que en la enfermedad celíaca (EC) ocurren alteraciones en su actividad y nuestro grupo ya ha realizado numerosos estudios previos evidenciando algunas de ellas.

Torres *et al.* (2006) reportó el aumento de la expresión de HLA-G soluble (sHLA-G) en suero y biopsias de pacientes con EC a diferencia de HLA-G de membrana. En este sentido, se relacionó con un posible mecanismo regulador mediado por empalme alternativo que derivaba en la expresión de isoformas solubles para contrarrestar la pérdida de tolerancia a antígenos orales que lleva asociada a un aumento de expresión de HLAG y el consecuente daño tisular y la

autoreactividad inmune. Torres *et al.* (2007) proporcionaron la primera evidencia de que la enzimaIDO se encontraba sobreexpresada en biopsias de tejido intestinal de pacientes celíacos, además de reportar niveles aumentados en suero de kinurenina, catabolito del triptófano que esta enzima genera en su actividad antiinflamatoria, lo cual fue propuesto como un potencial marcador indicativo del incremento de la inflamación durante la autoinmunidad asociada a la enfermedad. Datos presentados por López-Casado *et al.* (2017) reportaron la existencia de otra vía inmunomoduladora de la respuesta inmune y la inflamación en la EC, como es la vía IL33/ST2, cuyos patrones de expresión se detectaron anómalos, evidenciándose niveles séricos y tisulares elevados de IL-33 y sST2 en pacientes con EC, mostrando el papel del eje IL33/ST2 en la patogénesis de la enfermedad y su posible papel como biomarcador de la actividad de la enfermedad. En este contexto, es más que evidente que ciertas proteínas y sus diferentes funciones juegan un papel relevante en la patogenia de la EC, sin embargo aun quedan muchas de ellas que aún no han sido evaluadas y se desconoce su estado

PD-1: PD-L1/2

La molécula de muerte celular programada (PD-1) pertenece al conjunto de proteínas transmembrana que, como miembro de la familia de los CD28, forma parte del grupo de las inmunoglobulinas. Es considerado un punto de control inmunitario y un regulador co-inhibitorio fundamental para el mantenimiento de la tolerancia inmunitaria. Estructuralmente consta de un dominio extracelular similar a Ig-V, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático que alberga dos motivos de señalización basados en tirosina (Ishida *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 2004).

La expresión de PD-1 se ha observado en células T CD4+/CD8+ activadas, un subconjunto de células Treg, células B, células dendríticas mieloides, monocitos, células T agotadas y células madre mesenquimales basales. (Francisco *et al.*, 2010). La regulación de la expresión de PD-1 se produce de manera que, en células T en reposo, se mantienen los niveles de PD-1 bajos pero, tras un estímulo, PD-1 se expresa de forma transitoria en células T CD4+ y CD8+ y células B entre otras (Bally *et al.*, 2016; Salmaninejad *et al.*, 2018). Cuando la exposición a un antígeno se produce de forma aguda, los niveles de PD-1 permanecen a la baja, sin embargo, cuando dicha exposición es crónica PD-1, se sobreexpresa. (Bally *et al.*, 2016). Al producirse dicha sobreexpresión se puede ocasionar un desgaste funcional de PD-1, lo que le lleva a padecer signos de agotamiento.

PD-1 posee diferentes ligandos: PD-L1 (CD274, B7-H1) y PD-L2 (CD273, B7-DC) sin embargo, pese a que la afinidad de PD-L2 por PD-1 es superior que con PD-L1, este último se encuentra distribuido de forma más amplia en los diferentes tipos celulares (Salmaninejad *et al.*, 2018). Tanto PD-L1 como PD-L2 son glicoproteínas transmembrana de tipo I, que contienen dominios extracelulares similares a IgC e IgV de la familia B7 pero difieren en la longitud de sus colas citoplasmáticas. Como principal ligando de PD-1, PD-L1 induce una señal co-inhibitoria en células T activadas promoviendo la apoptosis de los linfocitos T y la exhaustión funcional (Francisco *et al.*, 2010).

Se considera crítico en la supresión de la autoinmunidad (Okazaki y Honjo, 2006.) siendo su función bastante importante en células T CD8 + (Chikuma *et al.*, 2009). PD-L1 se expresa constitutivamente a niveles bajos en APC tanto en las que expresan MHC de clase I y II y moléculas co-estimuladoras (pudiendo activar células T CD4 + vírgenes) como las que normalmente solo expresan MHC de clase I (de modo que pueden interactuar con células T CD8+ pero que no lo hacen con las células T CD4+ vírgenes de forma eficiente). Además, también se expresa en una amplia variedad de tipos de células no hematopoyéticas (Boussiotis, 2016). Las citoquinas son el origen del estímulo e inducción para la expresión de PD-L1, en concreto las citoquinas pro-inflamatorias, que incluyen interferones de tipo I y tipo II, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Boussiotis, 2016) mientras que PD-L2 es estimulada por interferones, IL-4 y el factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) en células dendríticas *in vitro* (Kinter *et al.*, 2008).

El efecto de la interacción entre PD-1 de las células T y PD-L1 expresado en las APC o en los tejidos es importante para la coinhibición durante la iniciación de una respuesta inmune por parte de las células T. La activación de células T también induce la expresión de PD-1, mientras que las citoquinas como INF- γ e IL-4, que se producen después de la activación de las células T, regulan los ligandos de PD-1, estableciendo un ciclo de retroalimentación que atenúa las respuestas inmunitarias y limita la extensión del daño tisular mediado por el sistema inmune a menos que la activación sea superada por fuertes señales co-estimuladoras (Freeman, 2008).

El eje PD-1/PD-L1 es un determinante crítico de la homeostasis inmune fisiológica por tener un papel de regulación negativa en las enfermedades autoinmunes, incluida la diabetes Tipo 1 (DT1) (Colli *et al.*, 2018), la esclerosis múltiple (EM) (Rui *et al.*, 2013), la enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) (Park *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2015), la artritis reumatoide (AR)

(Raptopoulou *et al.*, 2010), psoriasis (Kim *et al.*, 2016; Bartosinska *et al.*, 2017), y con lupus eritematoso (LES) (Nishimura *et al.*, 1999; Kasagi *et al.*, 2010).

Nielsen *et al.* (2005) describieron la existencia de 4 isoformas del gen PD-1, (PDCD1): PD-1 Δ ex2, PD-1 Δ ex3, PD-1 Δ ex2,3, PD-1 Δ ex2,3,4, originados por empalmes alternativos durante la transcripción del ARNm durante el proceso de corte y empalme de los diferentes exones, originando proteínas con diferencias estructurales y conduciendo a cambios funcionales de las proteínas traducidas, provocando que desempeñen una función diferente o incluso antagónica a la forma nativa. Además, determinaron que la presencia de formas solubles debido a dichos empalmes podía representar un riesgo para la homeostasis inmune al aumentar la diversidad y complejidad de la vía PD-1/PD-L1, acabando por mediar en enfermedades inmunes (Sharp y Pauken, 2018).

La reactividad inmunitaria de los puntos de control puede también verse afectada por polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), pudiendo ocurrir en regiones reguladoras y causar cambios que conducen a dañar o introducir sitios de unión para factores de transcripción y de esa manera ejercer influencia en el nivel de expresión de las moléculas codificadas y afectar la accesibilidad de la cromatina (Vockley *et al.*, 2017). También pueden introducir cambios en la estructura de las proteínas que pueden afectar la función de estas moléculas importantes para la actividad eficaz de la respuesta autoinmune. SNPs como PD1.3(G \rightarrow A) o PD1.5(C \rightarrow T) junto con otros polimorfismos que están ligados con el desarrollo de varias enfermedades autoinmunes (Prokunina *et al.*, 2002) pueden alterar la estabilidad del mRNA de PD-1 o sus niveles de expresión y se sabe que está asociado con unos niveles reducidos de inhibición de interferón gamma (IFN- γ) mediada por PD-1, se les atribuyen la presencia de linfocitos T CD4+ no funcionales (Gomez *et al.*, 2008) así como propiciar la inflamación del intestino (Francisco *et al.*, 2010).

ELAFIN

Elafin (inhibidor de peptidasa 3 [PI3]) es considerado un péptido defensa del huésped (PDH) (Wehkamp *et al.*, 2007) cuyo papel, al igual que el de su precursor biológicamente activo, la pre-elafina, es el de inhibir la serina proteasa humana, sintetizada por células epiteliales del tracto gastrointestinal, células inflamatorias (neutrófilos, macrófagos y mastocitos) entre otros tipos celulares (Wehkamp *et al.*, 2007; Shaw *et al.*, 2011). La estructura de la proteína viene

determinada por dos dominios: el dominio sustrato de la transglutaminasa (dominio NH₂) que permite la unión de la elafin a sitios específicos de las proteínas de la matriz extracelular y el dominio inhibidor de la elastasa (extremo C-terminal globular) que presenta actividad inhibidora de proteasas (Williams *et al.*, 2006; Shaw *et al.*, 2011; Verrier *et al.*, 2012).

La actividad antiproteasa del elafin se encuentra muy restringida y solo actúa inhibiendo ciertas proteasas endógenas, como algunas del tracto gastrointestinal o las presentes en procesos inflamatorios del intestino, tales como la elastasa y proteinasa-3 de los neutrófilos (Zani *et al.*, 2004). La acción de la actividad antiproteasa del elafin consiste en un mecanismo competitivo de unión estrecha con el sitio catalítico de la proteasa diana, bloqueando así el acceso de los sustratos de forma no covalente, regulado tanto por citoquinas como por estímulos inflamatorios (Wehkamp *et al.*, 2007; Shaw *et al.*, 2011).

De entre sus funciones, destaca la modulación de la inflamación del colon, la actividad antiproteasa, inmunomoduladora y antiproliferativa (Williams *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2007; Verrier *et al.*, 2012). Además, fue identificada como un sustrato de la transglutaminasa tisular (TG-2) (Steinert *et al.*, 1995; Baranger *et al.*, 2011), enzima que además, posee un papel trascendental en la patogenia de la EC (Kristiansen *et al.*, 1998).

Fue determinado en humanos en casos de psoriasis (Wiedow *et al.*, 1990) y dentro del espectro de trastorno de sensibilidad al gluten (GSD) ha sido descrito en dermatitis herpestiforme (DH) (Ollague y Nousari *et al.*, 2018) mostrando una disminución de la expresión epidérmica pese al aumento de estímulos inflamatorios.

Codificado por el gen PI3, se encuentra ubicado en el cromosoma 20q12-13.1, posee tres exones y un tamaño de 11620 pb (Sallenave y Silva., 1993; Saheki *et al.*, 1992). Chowdhury *et al.* (2006) mapearon PI3 e identificaron diferentes variantes de empalme que poseía dicho gen, con un total de 23 SNPs, que posteriormente Tejera *et al.* (2009) ampliarían a 24, algunos de ellos están asociados en cierto grado con ciertas enfermedades como con el síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS). Tejera *et al.* (2014) reportaron que el SNP *rs2664581*, localizado en el exón 2 del gen, ocasionaba una sustitución de aminoácidos de tirosina por prolina en la posición 34 del el dominio N-terminal del la preelafina, afectando a la capacidad del dominio para unirse a la TG-2 y proteger a las proteínas de la matriz extracelular de la degradación proteolítica.

CD200/CD200R

CD200 (OX2) es una glicoproteína transmembrana de tipo I perteneciente a la familia de supergenes de las inmunoglobulinas que se expresa en diferentes tipos celulares, tanto de origen hemaopoyético: células mieloides (DC, macrófagos) o linfoides (células T y B), como de origen no hematopoyético: células epiteliales, entre otras (Wright *et al.*, 2000; Barclay *et al.*, 2002; Wright *et al.*, 2003). También ha sido descrita sobreexpresándose en DC apoptóticas favorecida por la presencia de p53, proteína relacionada con la apoptosis (Rosenblum *et al.*, 2004) alterando la actividad de las células apoptóticas al suprimir la producción de IFN- γ y TNF- α (Fallarino *et al.*, 2004).

Por otro lado, la expresión de CD200R se encuentra restringida a ciertas poblaciones de células linfoides (células T CD4+) y APC derivadas de células mieloides (DC, macrófagos) (Wright *et al.*, 2003, Wright *et al.*, 2000; Gorczynski *et al.*, 2000).

CD200 se encuentra inducida por la activación del sistema inmunitario mediante la presencia de citoquinas que se generan durante la respuesta inflamatoria, entre las que se encuentra el TNF α y INF γ (Chen *et al.*, 2009). CD200 consta de un dominio terminal extracelular N₂ que contiene regiones similares a IgC e IgV, una región transmembrana y una cola citosólica COOH que carece capacidad de transmitir señales (Barclay *et al.*, 2002).

Su receptor, CD200R (OX2R), pese a presentar la misma estructura que el ligando, su cola citosólica (dominio intracitoplasmático C-terminal) previa unión con CD200, es capaz de transmitir señales reguladoras que controlan a la baja la actividad aumentada del sistema inmunitario para proteger al organismo de los daños causados por su hiperactividad (Holmannová *et al.*, 2012), interviniendo en la regulación de la función de los macrófagos y en el control de las respuestas aloinmunes y autoinmune.

De ese modo, el eje CD200:CD200R permite la inhibición directa de los leucocitos por interacción célula a célula y mediante polarización de células T en células iTreg o Tr1 (Holmannová *et al.*, 2012). Además, su interacción modula las citoquinas T_h1 o T_h2 en el entorno celular y también permite la activación directa de la vía inhibitoria de la enzimaIDO en la cual, con el metabolismo del triptófano (Fallarino *et al.*, 2004) en cinurenina, se suprime la respuesta

de las APC para evitar la autoreactividad (Holmannová *et al.*, 2012). CD200:CD200R media en la activación indirecta de IDO, interviniendo en su expresión en DC y Tregs tras la ligación a CTLA-4 (Soliman *et al.*, 2010).

La relevancia del mecanismo de señalización e inmunoregulación del eje CD200:CD200R fue observado por primera vez en modelos experimentales de ratones transgénicos knock-out (KO) con ausencia de expresión de CD200 por Wright *et al.* (2000) donde se bloqueó la expresión del ligando así como se inhibió la actividad del receptor por acción de antagonistas, resultando en el desarrollo de diferentes enfermedades autoinmunes.

Rosenblum *et al.* (2006) revelaron que en cultivos *in vitro* de células T CD4+ junto con DC de ratón con expresión de CD200 se atenuaba la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF α y INF γ) por parte de las células T autorreactivas con respecto a los de ratones CD200 deficientes (Kotwica *et al.*, 2021) como también se pudo comprobar en AR (Gorczynski *et al.*, 2001; Gorczynski *et al.*, 2002). Li *et al.* (2012) descubrieron que en LES, el eje CD200:CD200R puede regular la población de linfocitos T CD4+ (Kotwica *et al.*, 2021).

4. DESORDEN AUTOINMUNE

Cuando los mecanismos de tolerancia fallan y ocurre un desequilibrio en la homeostasis inmunitaria, se desencadena un conjunto de reacciones inmunes contra el huésped que deriva en el desarrollo de enfermedades autoinmunes.

Entre este complejo entramado de regulaciones, el desencadenamiento de enfermedades autoinmunes conlleva un cuadro clínico muy extenso y diagnóstico muy complejo donde participan una gran variedad de factores que actúan interrelacionadas entre sí, dando como resultado una patogenia sistémica u órgano-específica.

De entre el amplio abanico de casuísticas que abarca la autoinmunidad se encuentran los factores relacionados con la pérdida o alteración del mecanismo de tolerancia inmunológica, factores genéticos como polimorfismos, isoformas o la epigenética, factores ambientales como infecciones víricas o bacterianas, hormonas o agentes inorgánicos y factores inmunitarios como

los diferentes componentes del sistema inmune así como las diferentes vías de regulación y estimulación.

En general, existen similitudes entre factores genéticos, ambientales e inmunitarios compartidos entre enfermedades autoinmunes, lo que puede explicar la comorbilidad.

5. ENFERMEDAD CELÍACA

Como enfermedad integrada dentro del espectro de los desórdenes autoinmunes, la EC es un trastorno sistémico que sucede en individuos genéticamente predispuestos que desarrollan una reacción inmune a gluten, provocando una respuesta anómala de las células T y B hacia los autoantígenos, resultando en una cascada inflamatoria que genera la destrucción de tejidos del intestino delgado y una producción de autoanticuerpos descontrolada, con manifestaciones intestinales y extraintestinales. Para que este desorden autoinmune acontezca deben de coexistir una serie de componentes genéticos, como es la expresión de genes del antígeno leucocitario humano (HLA) de clase II (en concreto de sus variantes de haplotipo DQ2 o DQ8) (Lundin *et al.*, 1994) y ambientales (ingestión de gluten) (Lebwohl y Rubio-Tapia, 2021; Lebwohl *et al.*, 2018).

La predisposición genética al desarrollo de la EC fue determinada mediante estudios de asociación de todo el genoma (GWAS), encontrando variantes de riesgo en la región HLA, especialmente HLA-DQ2 (haplotipos DQ2.5 y DQ2.2) o HLA-DQ8 (Withoff *et al.*, 2016; Bodd *et al.*, 2012, Vader *et al.*, 2003; Van Heel *et al.*, 2007) junto con otros genes no HLA que también han sido asociados con la enfermedad (Hunt *et al.*, 2008; Trynka *et al.*, 2011) relacionados especialmente con la función de las células T y B.

5.1. Patogenia

El modelo patogénico más aceptado y ampliamente descrito para explicar la compleja casuística de la EC se basa en la dualidad que presenta el gluten para mediar en la inmunidad adaptativa (activación de linfocitos T CD4+) y en la innata (efecto citotóxico de los péptidos del gluten sobre el epitelio intestinal) (Lindfors *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2020) (Fig.2).

Como principal factor ambiental, el gluten, es una proteína de reserva presente en el trigo, centeno, cebada y avena entre otros (Abadie *et al.*, 2011) cuyo conjunto de proteínas se

denominan prolaminas. En el gluten del trigo y otros cereales del género *Triticum*, esas prolaminas las componen la gliadina y la glutenina, siendo la gliadina (α -gliadina) la fracción donde se ubican los péptidos más inmunológicos y citotóxicos del gluten (Ciccocioppo *et al.*, 2005). Estas proteínas son especialmente ricas en residuos de prolina (P) y glutamina (G), lo que las hace resistentes a la digestión total que ejercen las proteasas gástricas, pancreáticas y peptidasas de los enterocitos/ células epiteliales intestinales (CEI) (Shan *et al.*, 2002; Sollid, 2002). Sin embargo estas enzimas del tracto gastrointestinal generan fragmentos peptídicos de hasta 33 aa (Shan *et al.*, 2002) como el 33-mer que contiene 6 epítomos (Qiao *et al.*, 2004; Ozuna y Barro, 2018) que mayormente estimulan a las células T (Camarca *et al.*, 2009) y que desencadenan la mayor actividad inmuno-mediada o citotóxica en pacientes celíacos al atravesar estos la barrera epitelial del intestino delgado hacia la lámina propia (Shan *et al.*, 2002; Ciccocioppo *et al.*, 2005). Estos fragmentos peptídicos potencialmente nocivos son hidrolizados por la TG-2 (autoantígeno predominante de la EC) (Dieterich *et al.*, 1997) ya que contienen G que es su sustrato preferente, generando ácido glutámico, proceso que aumenta la inmunoreactividad (Wieser y Koehler, 2008) y la afinidad en la unión de las fracciones peptídicas a las moléculas HLA-DQ2 o HLA-DQ8 de las APC (Brown *et al.*, 2019). Esta asociación genera complejos DQ-Gluten (Folk, 1983) en las APC (Molberg *et al.*, 1998), que posteriormente son presentados a las células T CD4 + (Lundin *et al.*, 1993), desencadenando una respuesta inmune adaptativa en la lamina propia (Auricchio *et al.*, 2004) acompañada de una respuesta innata (Barone *et al.*, 2014) que conlleva el aumento patológico de linfocitos intraepiteliales (LIEs) en el compartimento epitelial (Abadie *et al.*, 2012).

Los complejos DQ-gluten activan la respuesta inmune adaptativa, al señalar a las células T CD4+ (Sollid y Khosla, 2011; Di Sabatino *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2007; Anderson *et al.*, 2000; Sollid *et al.*, 1989), promoviendo su diferenciación en un subconjunto de células T helper (T_H1) que proliferan (Dubois *et al.*, 2010; Abadie *et al.*, 2011; Trynka *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2012) y producen principalmente citoquinas de tipo T_H1 (Nilsen *et al.*, 1995), como IFN γ (Ferretti *et al.*, 2012) la cual activa la liberación de enzimas que pueden dañar la mucosa intestinal, con la consecuente pérdida de la estructura de las vellosidades (Kagnoff, 2005), así como IL-21 que activan a las células T CD8+ intraepiteliales (Jabri y Sollid, 2009). Posteriormente, por efecto de IL-15, dichas células T pueden llegar a diferenciarse en células natural killer (NK) citotóxicas que dañan a las CEI (Du Pré y Sollid, 2015; Parzanese *et al.*, 2017) por lo que un subconjunto de citoquinas, entre las que se incluyen el IFN γ y la IL-21, como

resultado de la activación inmunitaria adaptativa, sirven de enlace entre la inmunidad adaptativa e innata (Sarra *et al.*, 2013; Lindfors *et al.*, 2019).

Por otro lado, cuando las células T CD4⁺ se activan, también impulsan una diferenciación a otro subconjunto de células T helper (T_h2) que generan una respuesta de tipo T_h2 al producir la activación de los células B, así como su expansión clonal, llevándolas a diferenciarse en células plasmáticas y a producir anticuerpos anti gliadina (anti-AGA) y anti transglutaminasa tisular (anti-TG-2) (Torres *et al.*, 2015).

Por último, los péptidos de la gliadina que se encuentran en la lámina propia estimulan la producción de IL-23 y IL-1 β por parte de monocitos (DC y macrófagos activados). IL-1 β propicia y señala, a su vez, la síntesis de IL-23, activando la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ en un subconjunto de células T helper (T_h17) que promueven la producción de mediadores pro-inflamatorios como IL-17 (Harris *et al.*, 2008). La interacción entre las células secretoras de IL-17 y las células epiteliales provocan inflamación y daño tisular (Pastor-Fernández *et al.*, 2020).

Interacciones entre los péptidos tóxicos del gluten y células específicas en la lámina propia producen una respuesta innata que desencadena el aumento de expresión de IL-15, IL-18 e IFN γ ocasionando a su vez un aumento de CEI en las criptas de Lieberkühn, desencadenando en la hiperplasia en las criptas (Maiuri *et al.*, 2003) así como LIEs con el consecuente deterioro de la matriz de la mucosa (Pender *et al.*, 1996). IL-15 causa a su vez una inhibición de la labor del control de la homeostasis inmune de las T_{REGS} (Lindfors *et al.*, 2019). La siguiente fase es la atrofia de las vellosidades, inducida por la muerte de los CEI por los LIEs (Di Sabatino *et al.*, 2001).

Además de desencadenar una respuesta inmunitaria en pacientes con EC, los péptidos no digeridos del gluten quedan disponibles para las bacterias comensales intestinales y suponen una atractiva fuente de energía que la microbiota intestinal puede utilizar en su actividad metabólica. Además, los patógenos oportunistas y bacterias intestinales generan distintos patrones de degradación del gluten con mayor o menor inmunogenicidad que podrían influir en el riesgo autoinmunitario (Caminero *et al.*, 2016).

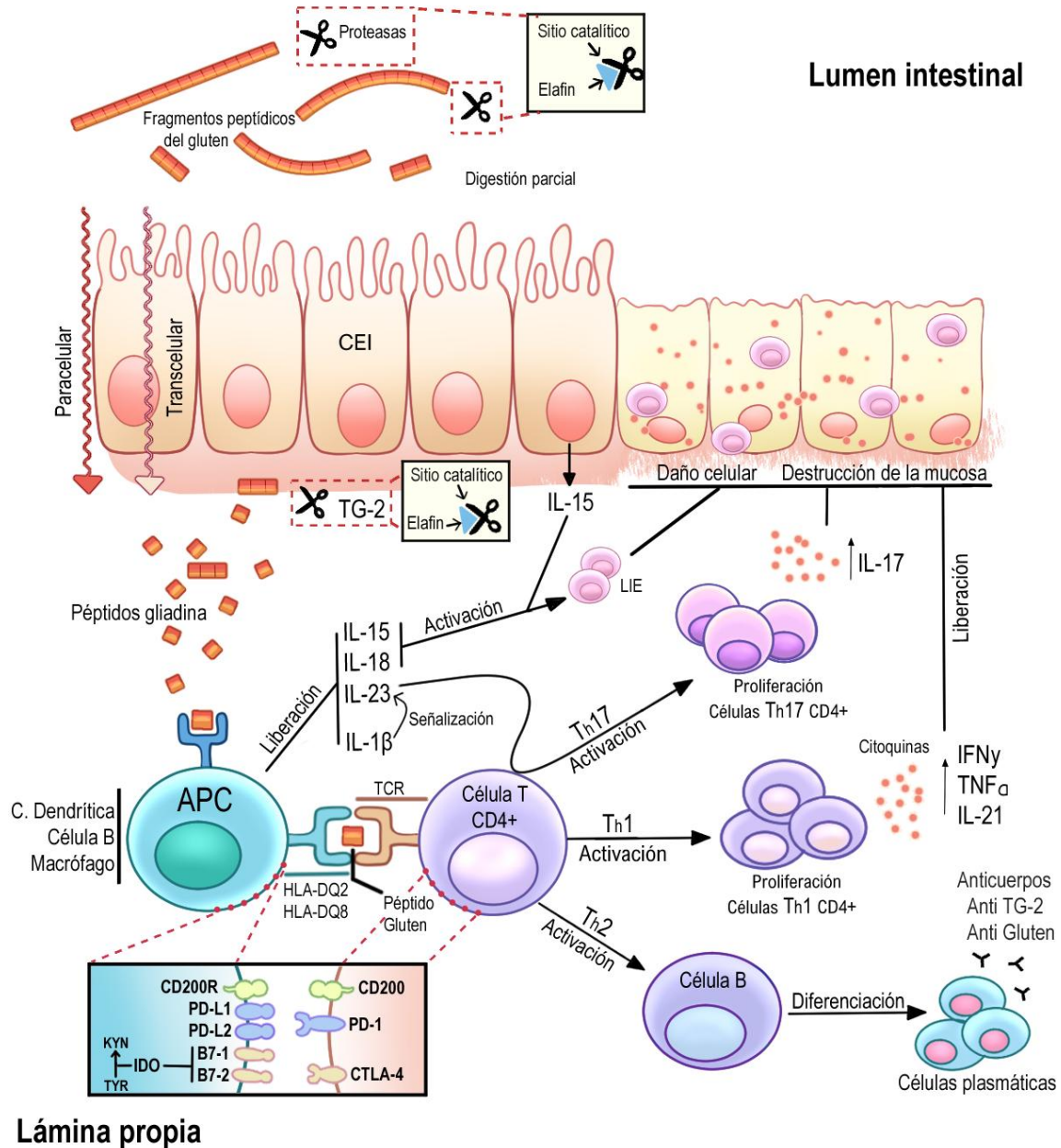


Figura 2. Representación esquemática global de la patogénesis de la EC y del área de acción de ciertos puntos de control inmunitarios. (Modificado según López Casado *et al.*, 2018; Lindfors *et al.*, 2019).

5.2. Epidemiología

La EC es una de las enfermedades autoinmunes mejor comprendidas pero, aún sigue siendo infradiagnosticada en los diferentes estudios epidemiológicos (Lionetti *et al.*, 2015), los cuales basan mayoritariamente sus indicadores en la tasa de seroprevalencia. Los niveles de prevalencia de la EC varían geográficamente y se correlacionan con la cantidad de ingesta de gluten (Ramakrishna *et al.*, 2016). Tras el último meta-análisis registrado a nivel global, la

prevalencia de la EC es del 1,4% (Singh *et al.*, 2018), existiendo marcadas diferencias geográficas, como en la población europea, alrededor del 1% y en la que, de igual manera, también existe disparidad entre países (Lindfors *et al.*, 2019, Singh *et al.*, 2018). En España, el último estudio epidemiológico situaba la prevalencia general en el 0.26% (Navalón-Ramon *et al.*, 2016) frente al 0.49% del anterior estudio registrado (Mariné *et al.*, 2011), poniendo en evidencia que los datos podrían llegar a ser mayores debido a la exclusión de los enfermos celíacos no detectados y formas silentes o asintomáticas. Además, estos estudios epidemiológicos también han ido descubriendo la tendencia de la EC en grupos de edad y sexo, determinando que existe 1.5 más mujeres que hombres afectados así como 2 veces más en niños que en adultos (Singh *et al.*, 2018).

5.3. Diagnóstico

La presentación de la enfermedad en un paciente potencial de EC es muy variada, con manifestaciones clínicas, intensidad de los síntomas y signos que pueden llegar a ser muy diferentes, incluso es habitual detectar formas oligosintomáticas o asintomáticas con enfermedad latente o potencial (Lebwohl y Rubio-Tapia, 2021). Por ello, el diagnóstico se fundamenta en una secuencia de estudios que varían según edad, síntomas y cuadro clínico (Bai *et al.*, 2016) Debido al carácter sistémico que caracteriza a la EC, sigue siendo una enfermedad infradiagnosticada que no cumple en la mayoría de los casos con el patrón clásico de la enfermedad (Catassi *et al.*, 2014), por lo que es necesario establecer criterios que permitan un diagnóstico fidedigno de la EC. El diagnóstico se desarrolla aunando datos clínicos junto con los serológicos, genéticos e histopatológicos (Tabla 1).

Tipo de estudio	Datos clínicos	
Serológico	Anticuerpos anti-transglutaminasa tisular 2 (anti-TG2) isotipo inmunoglobulina A (IgA) e IgG	
	Anticuerpos anti-endomisio (anti-EmA) isotipos IgA e IgG	
	Anticuerpos anti-péptidos desaminados de gliadina (anti-PDG) isotipos IgA e IgG	
	Anticuerpos anti-gliadina (anti-AGA) isotipos IgA e IgG	
Genético	HLA DQ2	DQB1*02
		DQA1*05
	HLA DQ8	DQA1*03
		DQB1*0302
Histológico	Biopsia duodenal	

Tabla 1. Criterios diagnósticos para informar de la EC activa en pacientes (Grupo de trabajo del Protocolo para el diagnóstico precoz de la enfermedad celíaca, 2018.)

Estudio Serológico

El estudio serológico lo componen una serie de tests que incluyen diferentes anticuerpos como son el anti-TG2, anti-EmA, anti-PDG y anti-AGA en orden de sensibilidad y especificidad diagnóstica (Lewis y Scott, 2010; Grupo de trabajo del Protocolo para el diagnóstico precoz de la enfermedad celíaca, 2018). Según los criterios diagnósticos ESPGHAN, los anticuerpos de preferencia para iniciar el diagnóstico de la EC son los anti-TG2 (Husby *et al.*, 2012, 2020). Cuando existe una deficiencia en el estudio del isotipo IgA se procederá con el estudio basado en el isotipo G (Grupo de trabajo del Protocolo para el diagnóstico precoz de la enfermedad celíaca, 2018).

Estudio Genético

A pesar de que los heterodímeros HLA-DQ2/HLA-DQ8 son los elementos fundamentales para el desarrollo de la EC, su expresión no está restringida a pacientes celíacos, ya que el 30-40% de la población los expresa. Por otro lado, su presencia es importante pero no es el determinante único, ya que pese a estar presentes en la población general, aproximadamente el 1% llega a desarrollar EC (Alaedini y Green, 2005; Sollid y Lie, 2005; Bourgey *et al.*, 2007). Sin embargo, son considerados de riesgo entre los pacientes con EC (Brown *et al.*, 2019), ya que más del 90% son portadores del heterodímero HLA DQ2 (codificado por los alelos HLA DQB1*02 y DQA1*05) mientras que alrededor del 10% restante porta el DQ8 (codificado por los alelos DQA1*03 y DQB1*0302) (Ludvigsson y Murray, 2019) en carga completa o portan uno de los alelos del DQ2 por separado, DQB1*02 (como parte de la molécula DQ2.2) o DQA1*05 (en la molécula DQ7.5) (Sollid, 2002).

El estudio genético del paciente puede realizarse mediante el genotipado de los loci o la determinación de los alelos y, aunque desempeña un papel importante en el diagnóstico, no se pueden tomar de forma aislada sin el resto de estudios (Grupo de trabajo del Protocolo para el diagnóstico precoz de la enfermedad celíaca, 2018; Sollid, 2002).

Estudio Histológico

Cuando los test genéticos y serológicos indican potencialidad de EC, las biopsias duodenales por endoscopia proporcionan una confirmación completa del diagnóstico

(Ludvigsson *et al.*, 2014). En este estudio se realiza la observación de las lesiones intestinales distintivas de la EC como son la atrofia de las vellosidades, hiperplasia de las criptas de Lieberkühn (Marsh y Crowe, 1995) así como la infiltración de LIE tanto en el epitelio, siendo en su mayoría células T CD8+ (Hujoel *et al.*, 2019) así como en la lámina propia, abundando las células B, junto con la pérdida total o parcial del ribete en cepillo. Aunque la ESPGHAN en su actual guía considera prescindible este estudio si se dan ciertos parámetros serológicos en grupos pediátricos, la confirmación de la EC mediante biopsia se considera un patrón determinante en según qué tipo de pacientes (Husby *et al.*, 2012, 2020).

Por lo tanto, según la ESPGHAN, en casos con pacientes cuyos síntomas clínicos que parezcan sugestivos de EC, se considerará positivo si se cumple lo siguiente: i) portador de los haplotipos HLA DQ2/DQ8, ii) anticuerpos anti-TG2 IgA x10 veces superior al valor de referencia iii) anti-EmA positivos iv) biopsias con grado 2-3 de Marsh (omitible en cierto subgrupo de pacientes pediátricos con niveles de auto-anticuerpos elevados). Si al realizar una correlación entre el test genético, serológico y la histología se comprueba que poseen un triple test positivo, el test otorga a ese paciente una probabilidad de padecer la enfermedad de un 100% (Husby *et al.*, 2012, 2020).

CAPÍTULO II - OBJETIVOS

En la presente Tesis Doctoral se han abordado los siguientes objetivos generales:

- 1) Identificar genes que participan en la tolerancia oral al gluten en pacientes celíacos.
- 2) Determinar, en un modelo *in vitro*, cómo la suplementación con péptidos inmunogénicos del gluten influyen en la expresión de diferentes genes reguladores de la respuesta linfocitaria y que controlan diferentes aspectos de la respuesta de las células T.
- 3) Comprobar y evaluar la expresión de ciertos genes relevantes para la EC tanto de forma constitutiva como tras el estímulo inmunogénico que desencadena la respuesta inmune inducida por el gluten.

Y, en base a estos, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- 1) Obtener muestras de PBMC y biopsia de pacientes celíacos.
- 2) Establecer cultivos celulares y estimularlos con diferentes péptidos inmunogénicos.
- 3) Determinar las subpoblaciones linfocitarias llevando a cabo su caracterización mediante marcadores moleculares y establecer su viabilidad diagnóstica en la EC.
- 4) Comprobar la actividad de PD-1 mediante marcadores específicos por citometría de flujo.
- 5) Evaluar los niveles de PD-1:PD-L1/2, elafin y CD200:CD200R solubles en suero mediante ELISA.
- 6) Caracterizar la expresión y función del eje PD-1:PD-L1/2, CD200-CD200R y elafin por inmunohistoquímica en el epitelio de la mucosa intestinal en EC activa.
- 7) Investigar si la interacción de CD200:CD200R conduce a una disminución de la activación, proliferación y producción de citoquinas tipo T_H17.
- 8) Examinar la presencia de isoformas de PD-1 en la EC activa.
- 9) Determinar la existencia de variantes genéticas en PD-1 y elafin.

CAPÍTULO III – RESUMEN DE LOS RESULTADOS

Diagnóstico: análisis serológico, genético e histológico y establecimiento del grupo de pacientes celíacos.

Al grupo de pacientes utilizados en los estudios se le realizó el diagnóstico con los diferentes marcadores serológicos, genéticos e histológicos según los diferentes criterios anatopatológicos, que resultaron positivos en celiaquía activa con signos clásicos de la enfermedad. Todos ellos presentaron, por un lado, niveles elevados de anti-EmA, anti-TG2 y anti-AGA y frecuencias elevadas de alelos de los haplotipos HLA considerados de riesgo alto o muy alto (DQA1*0501, DQB1*0201) para HLA-DQ2 y moderado-alto (DQA1*03:01, *03:03 – DQB1*03:02) para HLA-DQ8 según las recomendaciones para informar e interpretar los hallazgos genéticos de HLA en la enfermedad celíaca de la SEEC (Arranz *et al.*, 2018). Por último, se vieron presentes visibles alteraciones histológicas en el análisis de las biopsias duodeno-yeyunal en las que, según lo establecido por los criterios anatomopatológicos de la clasificación de Marsh (I-IV) (Marsh, 1992), todos los pacientes presentaron cierto grado de alteración de la mucosa intestinal, siendo mayoritario del grado IV de Marsh, donde se podía observar hipoplasia y vellosidades totalmente aplanadas, acompañado de pacientes con otros dos grados menos abundantes en el grupo de estudio pero que acarrearán lesiones de tipo I y III, es decir, con presencia de linfocitos intrapeiteliales sin atrofia y con atrofia parcial/ total respectivamente.

PD-1:PD-L1/2

- **Niveles elevados de sPD-1/ sPD-L1 en suero y de PD-L1 en epitelio intestinal.**

Los análisis iniciales de la expresión de PD-1/PD-L1 en biopsias de pacientes con EC activa y sujetos control mediante inmunohistoquímica proporcionaron, en primera instancia, las primeras evidencias de la ausencia de expresión de PD-1. En cambio, se observaron niveles elevados de PD-L1 tanto en la superficie de las células epiteliales intestinales como en la lámina propia.

En una evaluación de las frecuencias de células T positivas para PD-1 en pacientes con EC activa mediante citometría de flujo, se pudo observar un resultado negativo en el caso de linfocitos T CD8 + / PD-1 + y frecuencias muy bajas en el caso de las células T CD4 + / PD-1 +. Esto se correlacionó con los resultados obtenidos en la inmunohistoquímica y, en base a ello, se

realizó la determinación de los niveles en suero de las formas solubles de cada una de las proteínas (sPD-1 y sPD-L1) mediante ELISA de pacientes con EC activa, obteniéndose que los niveles de sPD-1 y sPD-L1 eran considerablemente más elevados en los pacientes celíacos que en el grupo control (**Artículo 1**).

- **Alta producción de IFN- γ pero niveles bajos de proliferación en PBMC.**

El potencial inmunogénico de los péptidos del gluten les hace capaces de estimular la producción de IFN- γ y la proliferación de células específicas en pacientes cuya dieta no ha sido libre de gluten. Mediante el establecimiento de cultivos *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con celiaquía activa y el tratamiento con diferentes péptidos de conocida gran potencia inmunogénica y de estimulación de producción de citoquinas pro-inflamatorias como es el péptido 33-mer y las líneas de trigo BW208 y D623 (Sánchez-León *et al.*, 2019), se evaluó el índice de estimulación (IE) así como de proliferación celular mediante bromodesoxiuridina (BrdU) y los niveles de IFN- γ mediante ELISA. Se obtuvieron valores de producción de IFN- γ altos en el grupo tratado por el péptido 33-mer seguido de las líneas de trigo D623 y BW208 (WT), viéndose también reflejado esos niveles altos en la diferencia con respecto al control positivo en sanos estimulados con fitohemaglutinina (PHA), una lectina que participa en la inducción de la actividad y proliferación linfocitaria, cuyo valor quedaba claramente por debajo de los resultados de los pacientes celíacos. Por otro lado, el IE de las células reveló que se produjo una respuesta proliferativa débil en las PBMC de pacientes celíacos con respecto a los valores de referencia de los controles sanos.

En un estudio más profundo para conocer como afectaba PHA a la expresión de PD-1, se analizó el estado de la proteína en pacientes celíacos por secuenciación de Sanger. Se obtuvo que, en ausencia de PHA, PD-1 se expresaba en su forma completa (687pb). Sin embargo, en células estimuladas con PHA, se generaba una proteína de tamaño inferior (531pb), dando indicios de que esas 156pb de las que carecía la proteína procedían de un empalme alternativo durante la maduración del preARNm, en la que se eliminaba al completo el exón 3, codificando una proteína carente de dicho exón y generando una variante (PD-1 Δ 3). En situaciones normales, dicho exón dota a la proteína del dominio transmembrana, por lo que se estaba expresando la forma soluble de ésta (sPD-1). Para poder contrastar la validez de los resultados obtenidos en pacientes celíacos, se realizó el análisis de PD-1 en las poblaciones

linfocitarias de células T CD4+ y CD8+ de controles sanos con y sin tratamiento con PHA, mostrando un aumento en la expresión de PD-1 en respuesta al tratamiento con PHA, predecible en CD4+ y con menos propensión en CD8+, indicando se produjo una estimulación correcta (**Artículo 2**).

- **Expresión aumentada de PD-L1/PD-L2 en tejido y sPD-1 en suero.**

Dados los indicadores previos, era determinante conocer el estado de la expresión de PD-1 y sus ligandos PD-L1/PD-L2 tanto en superficie celular como en suero, por lo que se llevó a cabo su localización por inmunohistoquímica en biopsia intestinal en pacientes con EC activa, haciendo uso de dos anticuerpos anti-PD-1, con diferentes inmunógenos: un péptido sintético dentro de la PD-1 humana aa 1-100 (terminal N), y un segundo con el epítipo en el rango de proteína de 24-170 aa, ambos con localización de membrana con un dominio extracelular similar a Ig-V. Dicha experiencia proporcionó una expresión negativa de PD-1 al mostrar poca o nula inmunoreacción ante dos inmunógenos. Por otro lado, los pacientes mostraron expresión de PD-L1 en lámina propia y criptas de Lieberkühn y PD-L2 en las células epiteliales intestinales. Por otro lado, la determinación del nivel sérico por ELISA de las variantes solubles: sPD-1, sPD-L1 y sPD-L2, mostraron niveles elevados en pacientes celíacos con respecto a los controles sanos en una concentración altamente significativa, destacando notablemente la de sPD-1 (**Artículo 2**).

- **Detección de isoformas conocidas de PD-1 e identificación de nuevas variantes.**

El patrón de expresión de las variantes de PD-1 en EC activa era un factor desconocido y era necesario evaluar de qué forma se regulaban. Haciendo uso de PBMC de pacientes con EC se analizó la intervención de los péptidos que más estimulaban la respuesta inmune para conocer el patrón de expresión de la maquinaria de corte y empalme que parecía estar funcionando en pacientes con EC activa. Las PBMC cultivadas *in vitro*, estimuladas con péptidos inmunogénicos (33-Mer, BW y D623) y posterior secuenciación del ADNc de PD-1 arrojaron diferentes fragmentos correspondientes a diferentes isoformas de PD-1: PD-1 Δ 3– 531pb, PD-1 Δ 2 – 327pb y PD-1 Δ 2,3 – 171pb. Estas variantes de empalme carecerían del exón 3, exón 2 o de ambos con respecto a la molécula completa flPD-1 (687pb) respectivamente. Mientras que la estimulación con péptidos de BW de tipo salvaje derivó en la expresión de flPD-1 y 1 Δ 3, la estimulación con D623 derivó en la expresión de flPD-1, PD-1 Δ 3, PD-1 Δ 2, PD-1 Δ 2,3, así como una nueva isoforma de PD-1(Δ 3*) de 489pb, con pérdida de 42pb al inicio del exón 2 y el exón 3

al completo. Por otro lado, 33-mer mostró la expresión de otras dos nuevas variantes isomórficas de PD-1 que resultaron de un empalme que incluía parte de ciertos intrones, un fragmento de 95pb del intrón situado entre el exón 3 y 4 (Full* 781pb) y otro segmento de 28pb del intrón situado entre el exón 2 y 3 (Full* 715pb). Por último y en contraste con lo anterior, en PBMC de controles sanos solo se reportó la presencia de fIPD-1. (**Artículo 2**).

- **Asociación no significativa entre SNPs de PD-1 y la enfermedad.**

Dos SNPs fueron genotipados utilizando el método de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs) basado en PCR. Las frecuencias de los alelos y genotipos estudiados resultaron ser consistentes con el equilibrio de Hardy-Weinberg. La χ^2 de Pearson y la prueba exacta de Fisher mostraron que no había una asociación significativa entre los genotipos y la EC ($p > 0,05$). Por lo tanto, con respecto al SNP PD-1.3 (G→A), aunque se vieron diferencias en la susceptibilidad a la EC por el genotipo AA con una Odds Ratio (OR) 1,08 superior y el genotipo GA con una OR 0,89 superior al genotipo de referencia más abundante en la población (GG - 1.00), no fueron estadísticamente significativas como para asegurar asociación de riesgo aumentado con la enfermedad. De igual manera, en el SNP PD-1.5 (C→T) se observó una ligera susceptibilidad al genotipo TT en pacientes celíacos, con una OR 0.83 veces mayor a la del genotipo de referencia (CC - 1.00) con respecto a los controles sanos, pero con una asociación no significativa.

Además no hubo una asociación significativa entre mujeres, hombres y los genotipos específicos de PD-1.3 y PD-1.5, sin embargo no es completamente descartable debido al pequeño número de pacientes masculinos con EC en este estudio (**Artículo 2**).

ELAFIN

- **Expresión elevada de elafin en tejido intestinal y niveles bajos en suero.**

En el estudio inmunohistoquímico sobre biopsia de duodeno mediante el anticuerpo anti-Elafin/ESI, encontramos elafin expresándose intensamente a lo largo del epitelio superficial del intestino, en las células de las criptas de Lieberkühn, así como en células de la lámina propia, incluyendo en células que podrían ser linfocitos. La presencia de elafin en suero fue analizada mediante un ensayo ELISA, encontrando que su expresión fue significativamente menor en los pacientes con EC activa que en los controles sanos (**Artículo 3**).

- **Asociación significativa entre *rs1733103* de elafin y la EC.**

Siguiendo el método establecido anteriormente para PD-1, las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas de los 3 SNPs estudiados fueron consistentes con el equilibrio de Hardy-Weinberg.

En el estudio de asociación de los diferentes modelos genotípicos con el riesgo de la EC entre los diferentes SNPs para grupos control y celíacos, se obtuvo que en *rs1733103*, el modelo codominante CT presentó una OR de 3.71, indicando que ese genotipo tenía 2.71 veces más riesgo que aquellos individuos que no lo presentaban, con un valor estadísticamente significativo ($p < 0.05$) y una bondad de ajuste (AIC) de 126,6 con respecto al genotipo de referencia (CC-1.00). El modelo dominante del alelo polimórfico CT/TT presentó una OR de 3.00, indicando que poseía 2.00 veces más riesgo que el genotipo de referencia, con un valor estadísticamente significativo ($p < 0.05$) y una AIC de 127,3. El modelo sobredominante C/T mostró una OR de 3.60, representó 2.60 veces más riesgo que el genotipo de referencia con un valor estadísticamente significativo ($p < 0.05$) y una AIC de 125,4. En cuanto a los SNP *rs41282752* y *rs2664581* no se identificaron modelos genotípicamente representativos ni con asociación lo suficientemente significativa de riesgo, sin embargo, en *rs2664581*, se apreció que, en los modelos donde el alelo polimórfico ejercía un papel dominante, existía un riesgo aumentado respecto a los modelos que no lo presentaban, siendo el modelo codominante C/A el más susceptible para la enfermedad con 1,03 veces más riesgo que el de referencia (AA-1.00). De igual manera no se observaron asociaciones de riesgo significativas entre hombres, mujeres y los genotipos específicos de los SNPs en el tamaño de muestra seleccionado en este estudio (**Artículo 3**).

CD200:CD200R

- **Expresión de CD200/CD200R en tejido intestinal y niveles elevados de sCD200/sCD200R en suero.**

El estudio de la distribución de la expresión de CD200, CD200R en pacientes con EC mediante inmunohistoquímica en tejidos de biopsia de duodeno permitió mostrar el patrón de expresión de CD200 y CD200R. Con el uso de los anticuerpos humanos anti CD200/OX2 y anti CD200R/OX2R, se reveló la presencia de expresión de ligando y receptor tanto en la superficie

del epitelio intestinal como en la lámina propia, mostrando diferencias significativas en las criptas de Lieberkühn, donde la expresión del receptor fue baja. En el conjunto de las células del epitelio intestinal, se obtuvo expresión intensa de CD200 en las células de las criptas de Lieberkühn. Además de la expresión epitelial, se señaló la expresión del ligando y receptor en células similares a linfocitos en la lámina propia. En la detección cuantitativa de la presencia de las proteínas sCD200 y sCD200R a nivel sérico por ELISA, se obtuvo que ambas se encontraban presentes en suero en una proporción mayor en pacientes con EC en comparación a los controles sanos. En lo referente a la asociación entre sexo, la edad, el estadio clínico y la histología, no se encontró una correlación consistente (**Artículo 3**).

- **Mayor producción de citoquinas T_H1 y T_H17 en subpoblaciones linfocitarias.**

Haciendo uso de MicroBeads para la separación y aislamiento fino de poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ en suero, se determinó el grado de respuesta a la producción de IFN- γ , mostrando un aumento significativo del grado de producción de linfocitos T CD4+ y CD8+ en pacientes con EC activa frente a controles sanos

Se conoce que los linfocitos de la lámina propia son capaces de producir IL-22 ante el estímulo del gluten y que esta media en la inducción de producción de IFN- γ de células T_H1. La distribución de células IL-17 y IL-22 positivas fue medido mediante inmunohistoquímica y procesada por microscopía confocal, mostrando la alterada distribución de las células productoras de dichas citoquinas a lo largo de la mucosa del intestino delgado. Ha sido reportado que procesos inflamatorios desencadenados por respuestas al gluten incentivan la producción de IL-23 en EC. Como otra citoquina T_H17, el análisis IL-23 por ELISA proporcionó datos séricos de pacientes con EC activa, reportando una concentración significativamente mayor respecto a los controles sanos (**Artículo 3**).

- **Niveles elevados de MIP-4 en suero.**

La proteína inflamatoria de macrófagos-4 (MIP-4) es una citoquina que interviene en la atracción de los linfocitos T CD4+ y CD8+ hacia las CD, desempeñando funciones en las respuestas inmunitarias adaptativas. Mediante un análisis por ELISA de muestras de suero, se obtuvieron concentraciones elevadas de esta proteína producidos por macrófagos provenientes de PBMC de pacientes celíacos con respecto a las de los controles sanos (**Artículo 3**).

CAPÍTULO IV – DISCUSIÓN

La EC es una patología autoinmune de desarrollo crónico y sistémico caracterizada por una reacción de intolerancia al gluten en individuos con una predisposición genética previa, provocando un daño severo a la mucosa del intestino delgado por la activación de las células T CD4+, aumentando el número de LIE y la atrofia en las vellosidades intestinales, lo que causa la reducción de la absorción de nutrientes (Sollid *et al.*, 1989; Anderson *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2007; Di Sabatino *et al.*, 2012). La enfermedad abarca varios genes, tanto los del MHC, HLA-DQ2 / HLA-DQ2 y, con menos frecuencia, otros genes no MHC (Green y Jabri, 2003). Los GWAS han demostrado la existencia de alteraciones genéticas a nivel de reguladores de la respuesta inmune en la EC (Hunt *et al.*, 2008; Garner *et al.*, 2009).

El sistema inmunitario ejerce el papel determinante de detección y eliminación de patógenos o células aberrantes mediante el mecanismo de reconocimiento de las células T de los MHC de las células diana. No obstante, este mecanismo universalmente reconocido y estudiado se encuentra intrínsecamente controlado y regulado por una serie de receptores/ligandos co-estimuladores y co-inhibidores que determinan la respuesta y actividad funcional de las células T, tratándose de puntos de control inmunitarios que, en muchos casos, limitan el daño tisular y controlan el mantenimiento de la autotolerancia periférica, concepto que impide la destrucción de células propias por el sistema inmune. Descubrimientos recientes en el funcionamiento y comportamiento de los puntos de control inmunitarios en distintas enfermedades los han puesto en el foco de atención como posibles futuras dianas debido a su potencial terapéutico. En la EC, los puntos de control inmunitario sufren alteraciones, lo que les lleva a una respuesta inmune aberrante al gluten y a una inflamación crónica en el intestino delgado.

Investigaciones realizadas con anterioridad otorgan a PD-1 el papel protector contra la autoinmunidad en modelos humanos y animales, como la realizada por Jiang *et al.* (2016) que pusieron en evidencia la necesidad de que PD-1 ejerza su papel de eliminar células T CD4+ autorreactivas y proteger contra la autoinmunidad. Por lo tanto, ante la activación masiva del proceso autoinmune, es necesario que exista una serie de ejes que preserven el equilibrio ante cualquier desbalance, existiendo de ese modo, entre otros, el eje PD-1:PD-L1, que participa de forma crucial en la regulación de la autoinmunidad, de modo que esta vía se regula al alza cuando se desarrollan procesos inflamatorios para evitar daños tisulares, la proliferación de células T efectoras, su posterior activación y la producción de citoquinas (Chulkina *et al.*, 2020).

En lo que respecta a los primeros resultados obtenidos en las etapas iniciales del estudio de la presente Tesis Doctoral, se proporcionaron las primeras evidencias de que en pacientes con EC activa existen diferencias en cuanto a la expresión de PD-1 y PD-L1 en epitelio, suero y una desregulación de la capacidad reguladora asociada a la vía. Se demostró la expresión negativa de PD-1 así como la sobreexpresión a diferentes niveles de PD-L1 en la superficie del epitelio intestinal de pacientes con EC activa. PD-1 y PD-L1 permiten el control de la tolerancia de las células T periféricas limitando la fase inicial de activación y expansión de las células T autorreactivas, restringiendo la función efectora y la lesión de órganos diana (Probst et al., 2005). Con esto, pudimos observar de primera mano los efectos devastadores que se obtienen de la ausencia de la labor mediadora de la tolerancia que ejerce PD-1 en las células T en la protección de los tejidos antes las respuestas autoinmunes que se ejercen durante la EC activa.

Las observaciones que obtuvimos en la expresión de PD-1 regulada a la baja en poblaciones linfocitarias de los pacientes con EC resultó intrigante, ya que fue descrito que PD-1 se expresa de forma inducible en células T CD4 + y CD8 + periféricas (Keir et al., 2008) por lo que su expresión estaba siendo anómala, su activación siendo inapropiada y su consecuente función estaba viéndose comprometida (Tarbell et al., 2004), sugiriéndose la importancia que posee para la vía PD-1: PD-L1 en la regulación de la tolerancia de la mucosa *in situ*. Lo anterior se ve reforzado con el hecho de que PD-1 juega un papel crucial en los mecanismos de tolerancia de las células T centrales y periféricas, ayudando a proteger los tejidos de las respuestas autoinmunes. Sin PD-1, el daño tisular excesivo mediado por el sistema inmunitario puede tener consecuencias catastróficas para los tejidos al no estar operativo el mecanismo de protección y mantenimiento de la tolerancia central y periférica de las células T. Dicha proteína es expresada por todas las células T durante la activación y actúa como un freno natural para moderar la sobreactivación de las respuestas de las células T, evitando una proliferación aberrante y el consecuente daño tisular generado (Sharpe y Pauken, 2018). Es importante poner en valor el relevante papel que ejerce la vía PD-1 en el mantenimiento de la homeostasis inmunitaria al ejercer un control en las respuestas desencadenadas por procesos inflamatorios como los ejercidos por las células T CD8+ que, de forma descontrolada pueden derivar en la producción de citoquinas como IFN γ y TNF- α (Sharpe y Pauken, 2018) fuertemente estimulantes de PD-L1 (Abiko et al., 2015) en células T, B, células endoteliales y células epiteliales.

Sin embargo, a pesar de las anomalías detectadas en PD-1, la expresión en respuesta a los inmunógenos fue positiva en el caso de PD-L1 y PD-L2 en lámina propia y células epiteliales

respectivamente, siendo estos hallazgos de una consistencia considerable, ya que otros estudios muestran una mayor expresión de PD-L1 en otras enfermedades autoinmunes humanas, regulándose al alza en el tejido intestinal inflamado (Beswick *et al.*, 2018; Scandiuizzi *et al.*, 2014). Esto pone de manifiesto que, para la correcta inducción de señales inhibitorias en células T activadas, es importante la correcta señalización del eje PD-1: PD-L1, ya que es un mecanismo molecular para el control de las células T específicas de antígenos cuya finalidad es evitar el daño tisular excesivo inducido por las respuestas inmunitarias (Keir *et al.*, 2007).

Mientras que PD-1 y PD-L1 han sido objeto de múltiples estudios en el terreno de las enfermedades autoinmunes, no ocurre de igual manera en el caso de PD-L2, existiendo solo algunos casos de estudios como en LES (Ferreiros-Vidal *et al.*, 2004; Tong *et al.*, 2020). Debido a esto, parece relevante que en nuestro estudio detectásemos la expresión de PD-L2 en las biopsias intestinales de pacientes con EC, permitiendo, de ese modo, tener la contemplación interesante de que en la EC, sPD-L2 podría actuar como un ligando señuelo, aumentando la activación de PD-1 de las células inmunes, amplificando con ello aún más el daño inmunopatológico. Sin embargo, si bien sería una aproximación a las observaciones obtenidas se requerirían estudios adicionales para probar esta teoría.

La expresión de PD-L1 y PD-L2 depende de distintos estímulos y estudios previos han puesto de manifiesto que PD-L1 no solo ejerce un efecto inhibitor en la inflamación sino también un papel inhibitorio de las funciones de las células T cuando se induce su expresión por patógenos bacterianos (Sahler *et al.*, 2018). De ese modo, bacterias comensales podrían participar de forma activa, regulando al alza la expresión PD-L1 en el epitelio, contribuyendo a la inflamación crónica, inhibiendo la función de células T en la mucosa. Por lo general, PD-L2 suele estar regulado a la baja para favorecer a PD-L1 como ligando prioritario para PD-1, a excepción de las respuestas T_H2 , que sucede al contrario (Yamazaki *et al.*, 2002; Ghiotto *et al.*, 2010). Diferentes grupos de investigación han demostrado que su expresión puede ser inducida por estímulos microambientales tanto en células inmunes como no inmunes (Schreiner *et al.*, 2008; Messal *et al.*, 2011, Lesterhuis *et al.*, 2011).

Ya ha sido descrito previamente el papel crítico de ciertas proteínas que sufren un corte y empalme anómalo durante la maduración de su ARNm, lo que deriva en la generación de una proteína singularmente diferente de un mismo gen, por lo general aberrante y que desencadena una serie de desestabilizaciones como puede ser la pérdida de dominios estructurales vitales

para su función o localización. Wan *et al.* (2006) demostraron que la proteína PD-1 se encontraba en el suero de pacientes con AR era el producto de la traducción del ARNm de PD-1 que era una forma generada por corte y empalme alternativo, generando la isoforma PD-1 $\Delta 3$. Al traducirse la proteína, esta perdería el dominio de transmembrana, de modo que solo podría ser determinada en suero y la cual ejercería un papel antagónico a las formas nativas de membrana, tal y como comprobaron en su estudio.

En cuanto a los niveles de sPD-1 en pacientes con EC, ya se había detectado previamente una baja expresión de la forma completa en tejido y aumentada en suero (**Artículo 1**), que quedó demostrado en un posterior estudio (**Artículo 2**) donde identificamos la sobreexpresión de sPD-1 y la transcripción de PD-1 $\Delta 3$, lo que arrojó una nueva evidencia de que la PD-1 está asociada con la EC y que su forma soluble podría desempeñar un papel clave junto a las citoquinas pro-inflamatorias tanto en el agotamiento como en la activación primaria de las células T como ya informaron Sharpe y Pauken (2018). La proteína sPD-1 puede funcionar como moduladora para aumentar la inmunidad de las células T. Este estudio sugiere que es probable que la isoforma soluble PD-1 $\Delta 3$ aún conserve la capacidad de unirse a PD-L1 / PD-L2 y que ejerza un bloqueo competencial con la forma completa de membrana de cara a su ligando. En pacientes con EC, el exceso de sPD-1 podría servir como un 'anticuerpo' para bloquear la vía PD-1 /PD-L1 y conducir a una proliferación aberrante de células T, derivando en el daño tisular observado en los tejidos. Que sPD-1 se exprese puede traer consigo la maduración de las células dendríticas mediada por linfocitos T activados y podría estar influida por el aumento de las respuestas de las células T, potenciando las respuestas inmunitarias de células T antígeno-específicas (Tarbell *et al.*, 2004).

El transcrito que codifica para la proteína completa de PD-1 (flPD-1) se encuentra conformada por 5 exones que componen estructural y funcionalmente la proteína final: el exón 1 (péptido líder; 76pb), exón 2 (dominio extracelular similar a IgV; 360pb), exón 3 (dominio transmembrana; 156pb), exones 4 y 5 (dominio intracelular; 35pb, 237 pb) (Garapati y Lefranc, 2007). Identificamos cuatro variantes de empalme (PD-1 $\Delta 2$ / PD-1 $\Delta 2,3$ /PD-1 $\Delta 3$ y PD-1 $\Delta 2, 3,4$) en las que encontramos diferentes anomalías. Entre la ya mencionada PD-1 $\Delta 3$, la isoforma PD-1 $\Delta 2$ se genera por la traducción del ARNm de PD-1 a excepción del exón 2 que, al ser traducido, se expresaría como una molécula de membrana que perdería la capacidad de unión a sus receptores PD-L1 / PD-L2. De igual manera, PD-1 $\Delta 2,3$ carecería de esa propiedad de unión al no poseer ni dominio extracelular ni transmembrana ya que el transcrito que codifica

para la proteína carece del exón 2 y 3. Por último, la traducción de PD-1 $\Delta 2, 3,4$ daría lugar a un único segmento intracelular de la proteína, generado por el exón 5. En cuanto a la importancia biológica de todas ellas, podría ir asociada en paralelo con un aumento de ARNm debido al aumento de expresión durante la proliferación celular aunque no tenemos evidencia de ninguna función biológica de los productos de esta transcripción ya que carecen de capacidad de unión a su receptor (dominio extracelular).

Además de las anteriormente descritas, se identificaron otras nuevas isoformas, dos de ellas tomarían diferentes partes de intrones durante el proceso de corte y empalme del ARNm, de modo que, por un lado, resultaría en la variante de 781 pb que introduce una secuencia de 95pb localizada entre los exones 4 y 5, generando un codón de parada prematuro (TAA). Esto provocaría una pérdida en la región codificada por dichos exones, traduciéndose en una proteína truncada. Por otro lado, se formaría la variante de 715 pb que introduciría una secuencia de 28pb entre los exones 2 y 3, lo que generaría una secuencia de aminoácidos totalmente diferente durante la lectura, por lo que la proteína seguramente no será funcional. Finalmente, en lo que respecta a la isoforma PD-1 $\Delta 3^*$ esta variante de 489 pb presentaba una delección al comienzo del exón 2, correspondiéndose con una nueva isoforma soluble que probablemente tendría efectos antagónicos sobre la forma de la membrana al interferir con su vía de señalización y también podría preservar la capacidad de unirse a los ligandos PD-L1 / PD-L2.

Gallego-Paez *et al.* (2017) sugirió que la maquinaria de corte y empalme desregulada, generando variantes de los genes, podría deberse a alteraciones en respuesta a estímulos concretos de factores externos, permitiéndonos esto hacer la valoración de que, en base a los resultados obtenidos, dicha maquinaria adaptaría la expresión génica a condiciones fisiopatológicas concretas. En el contexto de la EC, dichos factores externos podrían considerarse la presencia de péptidos derivados de la gliadina en el suero de pacientes con EC, lo cual podría modular la expresión y la función de la maquinaria de corte y empalme. En este sentido, nuestro estudio proporcionó la primera evidencia de que en la EC, los péptidos del gluten introducidos por la dieta podrían alterar el patrón de expresión de dicha maquinaria, generando variantes genéticas como mecanismo fisiológico para mantener la homeostasis celular. Esto ha venido siendo sugerido en diferentes estudios que muestran que los nutrientes pueden modular la expresión génica de proteínas reguladoras mediante corte y empalme alternativo (Ravi *et al.*, 2015) mientras que otros en procesos de corte y empalme anómalos

generarían proteínas defectuosas funcional y estructuralmente que podrían desencadenar y favorecer el desarrollo de algunas enfermedades humanas (Scotti y Swanson, 2016).

Se han reportado diferentes estudios que sitúan al gen PDCD1 como gen candidato (Prokunina *et al.*, 2002; Canto *et al.*, 2016) para estudios de polimorfismos debido a que se encuentra ubicado en el locus 2q37.3, cerca de una región del cromosoma 2 relacionado con la autoinmunidad (2q33.3) (Thorburn *et al.*, 2007). En la evaluación de la existencia de asociación entre las variaciones polimórficas de PD-1 y la EC en el contexto geográfico de región sur de España, se seleccionaron SNPs atendiendo a sus efectos en la estructura y funcionalidad de la proteína nativa. El SNP PD-1.3 altera el efecto inhibitor de PD-1 y aumenta la actividad de los linfocitos al producirse una anomalía en la regulación transcripcional y la expresión de PD-1 en el sitio polimórfico (Prokunina *et al.*, 2002; Kristjansdottir *et al.*, 2010) al producirse una sustitución de una guanina (G) por adenina (A) en el nucleótido + 7,146 en el intrón 4. El SNP PD-1.5 se caracteriza por una sustitución de citosina (C) por timina (T) en el nucleótido +7,785 del exón 5 de PDCD1, que produce una mutación silenciosa (alanina por alanina) en la proteína PD-1, no ejerciendo ningún cambio en la estructura final de los aminoácidos de la proteína, pero su relevancia puede ir asociada a otros SNPs del gen, introduciendo conjuntamente modificaciones a nivel de ARNm y proteína (Lin *et al.*, 2004). El estudio mostró principalmente que los polimorfismos PD1.3 y PD1.5 no estaban asociados con el riesgo de EC pero lo que si observamos es la tendencia a un aumento de las frecuencias de los alelos de G en PD1.3 y C en PD1.5 en pacientes con EC en comparación con los controles sanos, aunque dichas observaciones carecían de la suficiente significancia estadística.

Como otro eje con funciones en el mantenimiento de la tolerancia inmune y regulación de la liberación de citoquinas, la vía CD200:CD200R es un importante punto de control inmunitario que fue seleccionado para caracterizar su expresión en la EC, demostrando variaciones al alza tanto en tejido (CD200 y CD200R) como en niveles en suero (sCD200 y sCD200R) de pacientes celíacos con respecto a los controles sanos. Esto permitió proponer que existe un papel crítico en la interacción de sCD200 y CD200R y que afecta al eje CD200:CD200R. Además, de acuerdo a los resultados, la expresión de CD200 se encuentra regulada por IFN γ , siendo capaz de inducir su expresión. Con vista a los resultados, los niveles de sCD200 y sCD200R aumentados podrían desempeñar un papel vital modulando la respuesta inmunitaria y la inflamación para favorecer la tolerancia inmunológica pero, por contrapartida, podrían ejercer uniones competitivas con las formas nativas de membrana que podrían

desencadenar en una atenuación de la co-inhibición normal del eje. Como consecuencia, esto generaría una respuesta inmune descontrolada y más activa, con el consiguiente empeoramiento de la enfermedad.

Los macrófagos desempeñan un papel importante, considerado como clave, en el desarrollo y progresión de la EC, induciendo en las células T activadas la secreción de citoquinas, como el IFN γ . Por otro lado, durante un proceso inflamatorio, como respuesta inmunitaria, las quimiocinas movilizan células hematopoyéticas hacia el lugar donde tiene lugar. Es así como la proteína MIP-4 se encuentra expresándose en las células T CD4+ y CD8+, inducida posiblemente por estímulos debidos a los péptidos del gluten en la EC, generando distintos fenotipos de macrófagos activados alternativamente. Además, los macrófagos se consideran una de las principales fuentes de producción de IL-23 en el intestino, la cual estimula la expansión de las células T_h17, induciendo a su vez la producción de citoquinas inflamatorias como IL-17, IL-21 y IL-22. Nuestros descubrimientos mostraron que células T_h1 y T_h17 se encuentran acumulándose en la submucosa y en la muscularis propia en pacientes con EC, mostrando niveles elevados de IFN γ e IL-17 en comparación con los controles sanos. Dado que ya ha sido descrito que el IFN γ , secretado por células T activadas en la EC (Nilsen *et al.*, 1995), es capaz de activar a la TG-2 (DiRaimondo *et al.*, 2012) y también se sabe que IL17 e IL-22 funcionan como moduladores innatos de la integridad de la mucosa intestinal (Blaschitz y Raffatellu, 2010), planteamos la hipótesis de que, por efecto del gluten en pacientes con anticuerpos TG-2 positivos se alteraría la capacidad de los linfocitos para producir las citoquinas reguladoras de la integridad intestinal, provocando la reorganización característica de la estructura intestinal en la EC.

Elafin, proteína que se expresa en la superficie del epitelio intestinal entre otras superficies mucosas, posee un papel inmunoregulador, protector al amortiguar los efectos de los procesos inflamatorios durante la respuesta inmune. Galipeau *et al.* (2014) describió que el elafin se encontraba menos presente en pacientes con EC activa, reflejándose en la inflamación y los daños en el epitelio del intestino delgado, reportando una mejora de la inflamación y la recuperación de la barrera epitelial del intestino delgado en un modelo de ratón sensibles al gluten tratados con elafin. Además, refirieron la elafin como una molécula capaz de interactuar con los péptidos de gliadina y afectar a la TG-2 interviniendo en su desamidación. En nuestro estudio, mostramos que la expresión de elafin estaba restringida a la superficie apical de la mucosa intestinal, en la lámina propia y en la superficie de las criptas de Lieberkühn. Además,

pese a que no se encontraron correlaciones positivas con la actividad clínica de la enfermedad y los niveles séricos en el análisis de elafin soluble, en la EC, donde existe un desequilibrio entre las proteasas y sus inhibidores, dichas formas solubles pueden ayudar a neutralizar y compensar la inflamación excesiva y el daño celular.

Elafin es detectado principalmente en condiciones inflamatorias, sugiriéndose que sea inducible a estímulos pro-inflamatorios. En pacientes con EC activa, podría producirse aumento de la producción de elafin para contrarrestar la inflamación o/y provocar el reclutamiento de LIE. Estudios han demostrado que su expresión puede aumentar ante lipopolisacáridos (Simpson *et al.*, 2001), elastasa de neutrófilos (Reid *et al.*, 1999) y citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β o TNF- α (Bingle *et al.*, 2001, Pfundt *et al.*, 2000).

Se estudiaron diferentes SNPs relacionados con el gen PI3 y fueron seleccionados teniendo en cuenta que la región en la que se habían descrito era vital para la traducción de la proteína reguladora y de su actividad inhibidora, ya que *rs1733103* y *rs41282752* se ubicaban en el exón 1, región que codificaba para el péptido señal de la proteína y *rs2664581* se ubicaba en el exón 2 que, además, codificaba para el resto de la proteína final y para un sitio de unión para la TG-2. Dado a que todos ellos fueron descritos en los exones, regiones codificantes importantes y, considerando el tamaño muestral del estudio, encontramos que la asociación con la EC significativamente más fuerte entre los SNPs de estudio fue *rs1733103*. El genotipo que contenía el alelo menor polimórfico (T) de *rs1733103* estaba asociado con un riesgo aumentado, siendo el modelo sobredominante que mejor representaba dicha asociación con mayor bondad de ajuste y menor AIC.

Aunque no conseguimos encontrar una consistencia estadísticamente significativa en ninguno de los otros dos polimorfismos estudiados y, reconociendo algunas limitaciones en nuestro estudio, el SNP *rs2664581* mostró parámetros que indicaron una tendencia interesante. Aunque no se consideró significativo, cuando el alelo menor polimórfico (C) estaba presente y ejercía un papel dominante, la susceptibilidad para ser asociado como de riesgo para la enfermedad aumentaba, por lo que, a falta de replicas con tamaños de muestra mayores, podríamos mantener la hipótesis de que las variaciones en el empalme de PI3 podrían aumentar la susceptibilidad a la EC ya que ha sido previamente descrito que existen modificaciones en la función de genes reguladores asociados a variaciones de empalme alternativo en la EC.

CAPÍTULO V – CONCLUSIONES

1. Existen diferentes proteínas inmunoreguladoras que intervienen en la EC cuya actividad se encuentra comprometida o desregulada por alteraciones a nivel postraduccional que modifican la función nativa de las moléculas o vías que median en la tolerancia inmunológica de la respuesta inmune en pacientes con EC activa, contribuyendo a la inflamación y al proceso de autoinmunidad.
2. La vía PD-1: PD-L1/2 se encuentra altamente desregulada ya que, tanto el receptor como los ligandos, siendo proteínas reguladoras de membrana, muestran niveles anómalos de expresión en suero de pacientes celíacos. Esta condición de la vía viene acompañada por la expresión de diferentes isoformas de PD-1 generadas mediante corte y empalme alternativo del preRNA del gen durante su transcripción, produciéndose variantes que interceden en la vía de forma antagonista o modificando la funcionalidad normal y con ello, contribuyendo al desarrollo y patogénesis de la enfermedad.
3. A pesar de las frecuencias observadas de PD1.3 y PD1.5, estas no aportaron la suficiente significancia dentro del grupo de pacientes celíacos como para asociar que los SNPs fueran un factor de riesgo para la EC.
4. La vía CD200:CD200R presenta anomalías en la expresión de ciertos elementos en pacientes celíacos en forma de sobreexpresión del ligando y regulación a la baja del receptor en superficie celular, siendo significativamente mayor la de CD200 en su forma soluble en el suero en pacientes celíacos.
5. La interacción del eje CD200:CD200R posee el papel fundamental de modular la respuesta inmunitaria excesiva en procesos inflamatorios como ocurre durante la autoinmunidad y los consecuentes daños causados por una hiperactividad del sistema inmune ya que desencadena una potente inhibición de dicha respuesta, ayudando a mantener la autotolerancia.
6. Alteraciones en ciertas regiones consideradas de relevancia en la función y papel mediador de la proteína elafin ejercen un estado patológico en su expresión según diferentes modelos de asociación de genotipos con la enfermedad, apuntando a los SNPs *rs1733103* relacionado con el péptido señal junto con *rs2664581* relacionado con el punto de interacción con la TG-2.

7. La expresión de formas solubles de las diferentes proteínas y la expresión a la baja de las proteínas nativas de superficie en paciente celíacos sugieren que los péptidos del gluten pueden modular los procesos necesarios para la homeostasis celular de forma específica a través de la alteración de la expresión génica, en particular por el empalme alternativo del pre-ARNm que codifica proteínas reguladoras clave.

8. La expresión de diferentes puntos de control inmunitarios co-inhibitorios de forma simultánea puede reflejar un mecanismo de compensación entre ellos cuando fallan otras vías inmunoregulatoras como la inhibición directa.

9. El papel clave que ejercen que proteínas reguladoras del sistema inmune o puntos de control inmunitario en la EC (CD200,IDO, PD-1 y elafin) las hace ser consideradas como nuevas dianas de diagnóstico y terapia en la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- Abadie V, Discepolo V, Jabri B (2012). Intraepithelial lymphocytes in celiac disease immunopathology. *Semin Immunopathol.*, 34: 551–66. doi: 10.1007/s00281-012-0316-x.
- Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB, Jabri B (2011). Integration of Genetic and Immunological Insights into a Model of Celiac Disease Pathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.*, 29(1):493–525. doi: 10.1146/annurev-immunol-040210-092915.
- Abbas AK, Lohr J, Knoechel B, Nagabhusanam V (2004). T cell tolerance and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 3: 471-475. doi:10.1016/j.autrev.
- Abiko K, Matsumura N, Hamanishi J, Horikawa N, Murakami R, Yamaguchi K, Yoshioka Y, Baba T, Konishi I, Mandai M (2015). IFN- γ from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer. *Br. J. Cancer*, 112(9), 1501–1509. doi: 10.1038/bjc.2015.101.
- Alaedini A, Green PH (2005). Narrative review: celiac disease: understanding a complex autoimmune disorder. *Ann Intern Med.*, 142: 289-298. doi: 10.7326/0003-4819-142-4-200502150-00011.
- Anderson RP, Degano P, Godkin AJ (2000). *In vivo* antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. *Nat Med.*, 6: 337-342. doi: 10.1038/73200.
- Arranz E, Bilbao JR, Fernández-Bañares F. et al (2018). *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 110(7): 458-461. doi: 10.17235/reed.2018.5269/2017.
- Auricchio S, Barone MV, Troncone R (2004). Dietary proteins and mechanisms of gastrointestinal diseases: Gliadin as a model. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 39, S738–S739. doi: 10.1097/00005176-200406003-00011.
- Bai JC, Fried M, Corazza GR, Schuppan D, Farthing M, Catasi C, et al (2016) Celiac disease. *WGO Global Guidelines*.
- Bally AP, Austin JW, Boss JM (2016). Genetic and Epigenetic Regulation of PD-1 Expression. *J Immunol.*, 196(6):2431–7. doi: 10.4049/jimmunol.1502643
- Baranger K, Zani M, Labas V, Dallet-Choisy S, Moreau T (2011). Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) is, like its homologue trappin-2 (pre-elafin), a transglutaminase substrate. *PLoS one*, 6:e20976. doi.org/10.1371/journal.pone.0020976.
- Barclay AN, Wright GJ, Brooke G, Brown MH (2002). CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends Immunol.*, 23(6): 285–90. doi: 10.1016/s1471-4906(02)02223-8. PMID: 12072366.

- Barone MV, Troncone R, Auricchio S (2014). Gliadin peptides as triggers of the proliferative and stress/innate immune response of the celiac small intestinal mucosa. *Int J Mol Sci.*, 15:20518–20537. doi: 10.3390/ijms151120518.
- Bartosinska J, Zakrzewska E, Raczkiewicz D, Purkot J, Michalak-Stoma A, Kowal M, Krasowska D, Chodorowska G, Giannopoulos K (2017). Suppressed Programmed Death 1 Expression on CD4+ and CD8+ T Cells in Psoriatic Patients. *Mediators Inflamm.*, 5385102. doi: 10.1155/2017/5385102.
- Belkaid Y, Tarbell K (2009). Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. *Annual Review of Immunology*, 27:551-589. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132723.
- Beswick EJ, Grim C, Singh A, Aguirre JE, Tafoya M, Qiu S, Rogler G, McKee R, Samedi V, Ma TY, Reyes VE, Powell DW, Pinchuk IV (2018). Expression of Programmed Death-Ligand 1 by Human Colonic CD90+ Stromal Cells Differs Between Ulcerative Colitis and Crohn's Disease and Determines Their capacity to Suppress Th1 Cells. *Front Immunol.*, 9:1125. doi: 10.3389/fimmu.2018.01125.
- Bingle L, Tetley TD, Bingle CD (2001). Cytokine-mediated induction of the human elafin gene in pulmonary epithelial cells is regulated by nuclear factor-kappaB. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 25(1):84-91. doi: 10.1165/ajrcmb.25.1.4341.
- Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, Betts MR, Freeman GJ, Vignali DA, Wherry EJ (2009). Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nature Immunology*, 10:29-37. doi: 10.1038/ni.1679.
- Blaschitz C, Raffatellu M (2010). Th17 cytokines and the gut mucosal barrier. *J. Clin. Immunol.*, 30:196–203. doi: 10.1007/s10875-010-9368-7.
- Bodd M, Kim CY, Lundin KE, Sollid LM (2012). T-cell response to gluten in patients with HLA-DQ2.2 reveals requirement of peptide-MHC stability in celiac disease. *Gastroenterology*, 142:552–561. doi: 10.1053/j.gastro.2011.11.021.
- Bourgey M, Calcagno G, Tinto N, Gennarelli D, Margaritte-Jeannin P, Greco L, Limongelli MG, Esposito O, Marano C, Troncone R, Spampinato A, Clerget-Darpoux F, Sacchetti L (2007). HLA related genetic risk for coeliac disease. *Gut*, 56(8):1054-1059. doi: 10.1136/gut.2006.108530.
- Boussiotis VA (2016). Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. *N Engl J Med.*, 3; 375(18):1767-1778. doi: 10.1056/NEJMra1514296.

- Brown NK, Guandalini S, Semrad C, Kupfer SS (2019). A clinician's guide to celiac disease HLA genetics. *Am J Gastroenterol.*, 114:1587–1592. doi: 10.14309/ajg.0000000000000310.
- Bucks CM, Norton JA, Boesteanu AC, Mueller YM, Katsikis PD (2009). Chronic antigen stimulation alone is sufficient to drive CD8+ T cell exhaustion. *Journal of Immunology*, 182:6697-6708. doi: 10.4049/jimmunol.0800997.
- Camarca A, Anderson RP, Mamone G, Fierro O, Facchiano A, Costantini S, Zanzi D, Sidney J, Auricchio S, Sette A, Troncone R, Gianfrani C (2009). Intestinal T Cell Responses to Gluten Peptides Are Largely Heterogeneous: Implications for a Peptide-Based Therapy in Celiac Disease. *J Immunol.*, 182:4158–66. doi: 10.4049/jimmunol.0803181.
- Caminero A, Galipeau HJ, McCarville JL, Johnston CW, Bernier SP, Russell AK, Jury J, Herran AR, Casqueiro J, Tye-Din JA, Surette MG, Magarvey NA, Schuppan D, Verdu EF (2016). Duodenal bacteria from patients with celiac disease and healthy subjects distinctly affect gluten breakdown and immunogenicity. *Gastroenterology*, 151, 670–683. doi: 10.1053/j.gastro.2016.06.041.
- Canto LM, Farias TD, Medeiros MD, Coêlho CC, Sereia AF, de Carlos Back LK, de Mello FM, Zimmermann AF, Pereira IA, de Souza IR (2016). Association of PDCD1 Polymorphism to Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis Susceptibility. *Rev Bras Reumatol.*, 56(6):483–9. doi: 10.1016/j.rbre.2015.07.008.
- Catassi C, Gatti S, Fasano A (2014). The new epidemiology of celiac disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 59(Suppl 1):S7-9. doi: 10.1097/01.mpg.0000450393.23156.59.
- Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, Allison JP (2001). CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol.*, 19:565–94. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.565.
- Chen Z, Marseden PA, Gorczynski RM (2009). Role of a distal enhancer in the transcriptional responsiveness of the human CD200 gene to interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Mol Immunol.*, 46(10): 1951–63. doi: 10.1016/j.molimm.2009.03.015.
- Chikuma S, Terawaki S, Hayashi T, Nabeshima R, Yoshida T, Shibayama S, Okazaki T, Honjo T (2009). PD-1-Mediated Suppression of IL-2 Production Induces CD8+ T Cell Anergy *In Vivo*. *J Immunol.*, 182 (11) 6682-6689. doi: 10.4049/jimmunol.0900080.
- Chowdhury MA, Kuivaniemi H, Romero R, Edwin S, Chaiworapongsa T, Tromp G. (2006). Identification of novel functional sequence variants in the gene for peptidase inhibitor 3. *BMC Med Genet.*, 7, 49. doi.org/10.1186/1471-2350-7-49.

- Chulkina M, Beswick EJ, Pinchuk IV (2020). Role of PD-L1 in Gut Mucosa Tolerance and Chronic Inflammation. *Int J Mol Sci.*, 21:9165. doi: 10.3390/ijms21239165.
- Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Corazza GR (2005) The Immune Recognition of Gluten in Coeliac Disease. *Clin Exp Immunol.*, 140:408–16. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02783.x.
- Colli ML, Hill JLE, Marroquí L, Chaffey J, Dos Santos RS, Leete P, Coomans de Brachène A, Paula FMM, Op de Beeck A, Castela A, Marselli L, Krogvold L, Dahl-Jorgensen K, Marchetti P, Morgan NG, Richardson SJ, Eizirik DL (2018). PDL1 is expressed in the islets of people with type 1 diabetes and is up-regulated by interferons-alpha and-gamma via IRF1 induction. *EBioMedicine*, 36, 367–375. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.09.040.
- Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ, Graca L (2010). Mechanisms of tolerance and allergic sensitization in the airways and the lungs. *Current Opinion in Immunology*, 22:616-622. doi: 10.1016/j.coi.2010.08.014.
- Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ (2009). Natural and adaptive Foxp3+ regulatory T cells: More of the same or a division of labor? *Immunity*, 30:626-635. doi: 10.1016/j.immuni.2009.05.002.
- Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D (1997). Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med.*, 3: 797–801. doi: 10.1038/nm0797-797.
- DiRaimondo TR, Klock C, Khosla C (2012). Interferon- γ activates transglutaminase 2 via a phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway: implications for celiac sprue therapy. *JPET*, 341:104–114. doi: 10.1124/jpet.111.187385.
- Di Sabatino A, Vanoli A, Giuffrida P, Luinetti O, Solcia E, Corazza GR (2012). The function of tissue transglutaminase in celiac disease. *Autoimmun Rev* 11, 746-753. doi: 10.1016/j.autrev. 2012.01.007.
- Di Sabatino A, Ciccocioppo R, D'Alò S, Parroni R, Millimaggi M, Cifone MG, Corazza GR (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. doi: 10.1136/gut.49.3.380.
- Du Pré MF, Sollid LM (2015). T-cell and B-cell immunity in celiac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.*, 29(3): 413–23. doi: 10.1016/j.bpg.2015.04.001.
- Dubois PCA, Trynka G, Franke L, Hunt KA, Romanos J, Curtotti A, et al (2010). Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat. Genet.*, 42(4):295–302. doi: 10.1038/ng.543.

- Fallarino F, Asselin-Paturel C, Vacca C, Bianchi R, Gizzi S, Fioretti MC, Trinchieri G, Grohmann U, Puccetti P (2004). Murine plasmacytoid dendritic cells initiate the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in response to CD200 receptor engagement. *J. Immunol.*, 173:3748–3754. doi: 10.4049/jimmunol.173.6.3748.
- Ferreiros-Vidal I, Gomez-Reino JJ, Barros F, Carracedo A, Carreira P, Gonzalez-Escribano F, et al (2004). Association of PDCD1 With Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus: Evidence of Population-Specific Effects. *Arthritis Rheum.*, 50:2590–7. doi: 10.1002/art.20436.
- Ferretti G, Bacchetti T, Masciangelo S, and Saturni L (2012). Celiac Disease, Inflammation and Oxidative Damage: A Nutrigenetic Approach. *Nutrients*, 4 243-257. doi: 10.3390/nu4040243.
- Folk JE (1983). Mechanism and basis for specificity of transglutaminase-catalyzed (γ-glutamyl) lysine bond formation. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 54, 1–56. doi: 10.1002/9780470122990.ch1.
- Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH (2010) The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev.*, 236:219-42. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x.
- Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman, GJ, Kuchroo, VK, Sharpe, AH (2009). PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.*, 206, 3015–3029. doi: 10.1084/jem.20090847.
- Freeman GJ (2008). Structures of PD-1 with its ligands: sideways and dancing cheek to cheek. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 105(30):10275-6. doi: 10.1073/pnas.0805459105.
- Galipeau HJ, Wiepjes M, Motta JP, Schulz JD, Jury J, Natividad JM, Pinto-Sanchez I, Sinclair D, Rousset P, Martin-Rosique R, Bermudez-Humaran L, Leroux JC, Murray JA, Smecuol E, Bai J C, Vergnolle N, Langella P, Verdu E F (2014). Novel role of the serine protease inhibitor elafin in gluten-related disorders. *The American journal of gastroenterology*, 109(5), 748–756. doi: 10.1038/ajg.2014.48.
- Gallego-Paez LM, Bordone MC, Leote AC, Saraiva-Agostinho N, Ascensão-Ferreira M, Barbosa-Morais NL (2017). Alternative Splicing: The Pledge, the Turn, and the Prestige: The Key Role of Alternative Splicing in Human Biological Systems. *Hum Genet.*, 136(9):1015–42. doi: 10.1007/s00439-017-1790-y.
- Garner CP, Murray JA, Ding YC, Tien Z, Van Heel DA, Neuhausen SL (2009). Replication of Celiac Disease UK Genome-Wide Association Study Results in a US Population. *Hum Mol Genet.*, 18:4219–25. doi: 10.1093/hmg/ddp364.

- Garapati VP, Lefranc MP (2007). IMGT Colliers de Perles and IgSF domain standardization for T cell costimulatory activatory (CD28, ICOS) and inhibitory (CTLA4, PDCD1 and BTLA) receptors. *Dev Comp Immunol.*, 31(10):1050-72. doi: 10.1016/j.dci.2007.01.008.
- Ghiotto M, Gauthier L, Serriari N, Pastor S, Truneh A, Nunès JA, et al (2010). PDL1 and PD-L2 Differ in Their Molecular Mechanisms of Interaction With PD-1. *Int Immunol.* 22:651–60. doi: 10.1093/intimm/dxq049.
- Gomez GVB, Rinck-Junior JA, Oliveira C, Silva DHL, Mamoni RL, Lourenço GJ, Moraes AM, Lima CSP (2018). PDCD1 gene polymorphisms as regulators of T-lymphocyte activity in cutaneous melanoma risk and prognosis. *Pigment Cell Melanoma Res*, 31:308-317. doi: 10.1111/pcmr.12665.
- Gorczynski RM, Chen Z, Yu K, Hu J (2001). CD200 Immuno-adhesin Suppresses Collagen-Induced Arthritis in Mice. *Clin. Immunol.*, 101:328–334. doi: 10.1006/clim.2001.5117.
- Gorczynski RM, Chen Z, Lee L, Yu K, Hu J (2002). Anti-CD200R Ameliorates Collagen-Induced Arthritis in Mice. *Clin. Immunol.*, 3:256–264. doi: 10.1006/clim.2002.5232.
- Gorczynski RM, Kay Y, Clark, D (2000). Receptor engagement on cells expressing a ligand for the tolerance-inducing molecule OX2 induces immunoregulatory population that inhibits alloreactivity *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.*, 165, 4854–4860. doi: 10.4049/jimmunol.165.9.4854.
- Green P, Jabri B (2003). Coeliac Disease. *Lancet*, 362:383–91. doi: 10.1016/S0140-6736(03)14027-5.
- Grupo de trabajo del Protocolo para el diagnóstico precoz de la enfermedad celíaca. (2018). Protocolo para el diagnóstico precoz de la enfermedad celíaca. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. *Servicio de Evaluación del Servicio Canario de la Salud (SESCS)*.
- Holmannová D, Kolácková M, Kondélková K, Kunes P, Krejsek J, Andrýs C (2012) CD200/CD200R paired potent inhibitory molecules regulating immune and inflammatory responses; Part I: CD200/CD200R structure, activation, and function. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 55(1):12-7. doi: 10.14712/18059694.2015.68.
- Huang C, Zhu HX, Yao Y, Bian ZH, Zheng YJ, Li L, Moutsopoulos HM, Gershwin ME, Lian ZX (2019). Immune checkpoint molecules. Possible future therapeutic implications in autoimmune diseases. *J Autoimmun.*, 104:102333. doi: 10.1016/j.jaut.2019.102333.
- Hujoel IA, Reilly NR, Rubio-Tapia A (2019). Celiac disease: clinical features and diagnosis. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, 48(1):19-37. doi: 10.1016/j.gtc.2018.09.001.

- Hunt KA, Zhernakova A, Turner G et al (2008). Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response. *Nat Genet.*, 40:395–402. doi: 10.1038/ng.102.
- Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IRR, Mearin MLL, Phillips A, Shamir R, et al (2012). European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 54(1):136–60. doi: 10.1097/MPG.0b013e31821a23d0.
- Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó I, Kurppa K, Mearin ML, Ribes-Koninckx C, Shamir R et al. (2020). European Society Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Guidelines for Diagnosing Coeliac Disease 2020. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 70(1):141-156. doi:10.1097/MPG.0000000000002497.
- Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.*, 11(11):3887-95. doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x.
- Jabri B, Sollid LM (2009). Tissue-mediated control of immunopathology in coeliac disease. *Nat Rev Immunol.*, (12): 858–70. doi: 10.1038/nri2670.
- Jadue AN, González AI (2012). Inmunopatogenia de las enfermedades autoinmunes. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(4): pp.464-472. doi: 10.1016/S0716-8640(12)70337-1.
- Jenkins MK, Schwartz RH (1987). Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T-cell unresponsiveness *in vitro* and *in vivo*. *The Journal of Experimental Medicine*, 165:302-319. doi: 10.1084/jem.165.2.302.
- Jiang TT, Martinov T, Xin L, Kinder JM, Spanier JA, et al (2016). Programmed death-1 culls peripheral accumulation of high-affinity autoreactive CD4 T cells to protect against autoimmunity. *Cell Rep.*, 17:1783-94. doi: 10.1016/j.celrep.2016.10.042.
- Kagnoff MF (2005). Overview and pathogenesis of celiac disease. *Gastroenterology*, 128, 10–18. doi: 10.1053/j.gastro.2005.02.008.
- Kahan SM, Wherry EJ, Zajac AJ (2015). T cell exhaustion during persistent viral infections. *Virology*, 479:180-193. doi: 10.1016/j.virol.2014.12.033.
- Karandikar NJ, Vanderlugt CL, Bluestone JA, Miller SD (1998). Targeting the B7/CD28: CTLA-4 costimulatory system in CNS autoimmune disease. *J Neuroimmunol.*, 89(1– 2):10–8. doi: 10.1016/s0165-5728(98)00058-7.
- Kasagi S, Kawano S, Okazaki T, et al (2010). Anti-programmed cell death 1 antibody reduces CD4+PD-1+ T cells and relieves the lupus-like nephritis of NZB/W F1 mice. *J. Immunol.*, 184 (5) 2337–2347. doi: 10.4049/jimmunol.0901652.

- Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 26, 677–704. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331.
- Keir ME, Francisco LM, Sharpe AH (2007). PD-1 and its Ligands in T-cell Immunity. *Curr Opin Immunol.*, 19:309–14. doi: 10.1016/j.coi.2007.04.012.
- Kim JH, Choi YJ, Lee BH, et al (2016). Programmed cell death ligand 1 alleviates psoriatic inflammation by suppressing IL-17A production from programmed cell death 1-high T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 137 (5) 1466–1476 e1463. doi: 10.1016/j.jaci.2015.11.021.
- Kinter AL, Godbout EJ, McNally JP, Sereti I, Roby GA, O’Shea MA, Fauci AS (2008). The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *J Immunol.*, 181: 6738-6746. doi: 10.4049/jimmunol.181.10.6738.
- Harris KM, Fasano A, Mann DL (2008). Cutting edge: IL-1 controls the IL-23 response induced by gliadin, the etiologic agent in celiac disease. *J Immunol.*, 181(7):4457-60. doi: 10.4049/jimmunol.181.7.4457.
- Komatsu N, Mariotti-Ferrandiz ME, Wang Y, Malissen B, Waldmann H, Hori S (2009). Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: A committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(6):1903-1908.
- Kotwica-Mojzych K, Jodłowska-Jędrych B, Mojzych M (2021). CD200:CD200R Interactions and Their Importance in Immunoregulation. *Int J Mol Sci.*, 22(4):1602. doi: 10.3390/ijms22041602.
- Kumar V, Wijmenga C, Withoff S (2012). From genome-wide association studies to disease mechanisms: celiac disease as a model for autoimmune diseases. *Semin Immunopathol.*, 34:567–580. doi: 10.1007/s00281-012-0312-1.
- Kristiansen C, Madsen L, Fugger L, et al (1998). Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med.*, 4:713–7. doi: 10.1038/nm0698-713.
- Kristjansdottir H, Steinsson K, Gunnarsson I, Gerður G, Kristján E, Alarcón-Riquelme ME, et al (2010). Lower Expression Levels of the Programmed Death 1 Receptor on CD4+CD25+ T Cells and Correlation With the PD-1.3A Genotype in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Arth Rheumatol.*, 62(6):1702–11. doi: 10.1002/art.27417.

- Lebwohl B, Sanders, DS, Green, PHR (2018). Coeliac disease. *Lancet*, 391(10115):70-81. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31796-8.
- Lebwohl B, Rubio-Tapia A (2021). Epidemiology, presentation, and diagnosis of celiac disease. *Gastroenterology*, 160(1):63-75. doi: 10.1053/j.gastro.2020.06.098.
- Lesterhuis WJ, Steer H, Lake RA (2011). PD-L2 Is Predominantly Expressed by Th2 Cells. *Mol Immunol.*, 49:1–3. doi: 10.1016/j.molimm.2011.09.014.
- Lewis NR, Scott BB (2010). Meta-analysis: deamidated gliadin peptide antibody and tissue transglutaminase antibody compared as screening tests for coeliac disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 31(1):73-81. doi: 10.1111/j.1365-2036.2009.04110.x.
- Li Y, Zhao LD, Tong LS, Qian SN, Ren Y, Zhang L., Ding X, Chen Y, Wang YX, Zhang W, et al (2012). Aberrant CD200/CD200R1 expression and function in systemic lupus erythematosus contributes to abnormal T-cell responsiveness and dendritic cell activity. *Arthritis Res. Ther.*, 14:R123. doi: 10.1186/ar3853
- Lin SC, Yen JH, Tsai JJ, Tsai W, Ou T, Liu H and Chen C (2004). Association of a programmed death 1 gene polymorphism with the development of rheumatoid arthritis, but not systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 50: 770-775. doi: 10.1002/art.20040.
- Lindfors K, Ciacci C, Kurppa K, Lundin KEA, Makharia GK, Mearin ML, Murray JA, Verdu EF, Kaukinen K (2019). Coeliac disease. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 5(1):3. doi: 10.1038/s41572-018-0054-z.
- Lionetti E., Gatti S., Pulvirenti A., Catassi C. (2015). Celiac disease from a global perspective. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.*, 29: 365–79.
- López Casado MÁ, Lorite P, Ponce de León C, Palomeque T, Torres MI (2018). Celiac Disease Autoimmunity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 66(6):423-430. doi: 10.1007/s00005-018-0520-z.
- Ludvigsson JF, Murray JA (2019). Epidemiology of celiac disease. Review Gastroenterol. *Clin. North. Am.*, 48(1):1-18. doi: 10.1016/j.gtc.2018.09.004.
- Ludvigsson JF, Bai JC, Biagi F, Card TR, Ciacci C, Ciclitira PJ, et al (2014). Diagnosis and management of adult coeliac disease: guidelines from the British Society of Gastroenterology. *Gut*, 63(8):1210–28. doi: 10.1136/gutjnl-2013-306578.
- Lundin KE, Gjertsen HA, Scott H, et al (1994). Function of DQ2 and DQ8 as HLA susceptibility molecules in celiac disease. *Hum Immunol.*, 41:24–27. doi: 10.1016/0198-8859(94)90079-5.

- Lundin KE, Scott H, Hansen T et al (1993). Gliadin-specific, HLA-DQ($\alpha 1^*0501$ $\beta 2^*0201$) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. *J Exp Med.*, 178:187–196. doi: 10.1084/jem.178.1.187.
- López-Casado MA, Lorite P, Palomeque T, Torres MI (2017). Potential Role of the IL-33/ST2 Axis in Celiac Disease. *Cell Mol Immunol.*, 14(3):285–92. doi: 10.1038/cmi.2015.85.
- 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. doi: 10.1016/S0140-6736(03)13803-2.
- Mariné M, Farre C, Alsina M, Vilar P, Cortijo M, Salas A, et al (2011). The prevalence of coeliac disease is significantly higher in children compared with adults. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 33(4):477–86. doi: 10.1111/j.1365-2036.2010.04543.x.
- Marsh MN (1992). Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology*, 102(1):330–54.
- Marsh MN, Crowe PT (1995). Morphology of the mucosal lesion in gluten sensitivity. *Baillieres Clin. Gastroenterol.*, 9:273–93. doi: 10.1016/0950-3528(95)90032-2.
- Matzinger P (1994). Tolerance, damage, and the extended family. *Annual Review of Immunology*, 12, pp. 991-1045. doi: 10.1146/annurev.iy.12.040194.005015.
- Messal N, Serriari NE, Pastor S, Nunès JA, Olive D (2011). PD-L2 Is Expressed on Activated Human T Cells and Regulates Their Function. *Mol Immunol.*, 48:2214–9. doi: 10.1016/j.molimm.2011.06.436.
- Molberg O, Mcadam SN, Körner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L, et al (1998). Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat. Med.*, 4(6):713–7. doi: 10.1038/nm0698-713.
- Mousset CM, Hobo W, Woestenenk R, Preijers F, Dolstra H, van der Waart AB (2009). Comprehensive Phenotyping of T Cells Using Flow Cytometry. *Cytometry A.*, 95(6):647-654. doi: 10.1002/cyto.a.23724.
- Nielsen C, Ohm-Laursen L, Barington T, Husby S, Lillevang ST (2005). Alternative Splice Variants of the Human PD-1 Gene. *Cell Immunol.*, 235(2):109–16. doi: 10.1016/j.cellimm.2005.07.007.
- Nilsen EM, Lundin KEA, Krajei P, Scott H, Sollid LM, Brandtzaeg P (1995). Gluten specific, HLA-DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon γ . *Gut*, 37:766–76. doi: 10.1136/gut.37.6.766.

- Navalón-Ramon E, Juan-García Y, Pinzón-Rivadeneira A (2016). Prevalencia y características de la enfermedad celíaca en la fachada mediterránea peninsular. *Semergen*, 42(8):514-52. doi: 10.1016/j.semerg.2015.09.016.
- Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T (1999). Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*, 11:141–151. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80089-8.
- Okazaki T, Honjo T (2006). The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol.*, 27(4):195-201. doi: 10.1016/j.it.2006.02.001.
- Ollague JE, Nousari CH (2018). Expression of Elafin in Dermatitis Herpetiformis. *Am J Dermatopathol.*, 40(1):1-6. doi: 10.1097/DAD.0000000000000915.
- Oosterwegel MA, Greenwald RJ, Mandelbrot DA, Lorschach RB, Sharpe AH (1999). CTLA-4 and T cell activation. *Curr Opin Immunol.*, 11(3):294–300. doi: 10.1016/s0952-7915(99)80047-8.
- Ozuna CV, Barro F (2018). Characterization of Gluten Proteins and Celiac Disease-Related Immunogenic Epitopes in the Triticeae: Cereal Domestication and Breeding Contributed to Decrease the Content of Gliadins and Gluten. *Mol Breed*, 38:22–30. doi: 10.1007/s11032-018-0779-0.
- Park SJ, Kim JH, Song MY, Sung YC, Lee SW, Park Y (2017). PD-1 deficiency protects experimental colitis via alteration of gut microbiota. *BMB Rep.*, 50 (11) 578–583. doi: 10.5483/bmbrep.2017.50.11.165.
- Parzanese I, Qehajaj D, Patrinicola F, Aralica M, Chiriva-Internati M, Stifter S, et al (2017). Celiac disease: from pathophysiology to treatment. *World J Gastrointest Pathophysiol.*, 8(2): 27–38. doi: 10.4291/wjgp.v8.i2.27.
- Pastor-Fernández G, Mariblanca IR, Navarro MN (2020). Decoding IL-23 Signaling Cascade for New Therapeutic Opportunities. *Cells*, 9, 2044. doi:10.3390/cells9092044.
- Pender SL, Lionetti P, Murch SH, Wathan N, MacDonald TT (1996). Proteolytic degradation of intestinal mucosa extracellular matrix after lamina propria T cell activation. *Gut*, 39, 284–290. doi: 10.1136/gut.39.2.284.
- Pfundt R, Wingens M, Bergers M, Zweers M, Frenken M, Schalkwijk J (2000). TNF-alpha and serum induce SKALP/elafin gene expression in human keratinocytes by a p38 MAP kinase-dependent pathway. *Arch Dermatol Res.*, 292(4):180-7. doi: 10.1007/s004030050475.

- Probst HC, McCoy K, Okazaki T, Honjo T, Van den Broek M (2005). Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat Immunol.*, 6:280–286. doi: 10.1038/ni1165.
- Prokunina L, Castillejo-Lopez C, Oberg F, Gunnarsson I, Berg L, Magnusson V, et al (2002). A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat Genet.*, 32(4):666–9. doi: 10.1038/ng1020.
- Qiao SW, Bergseng E, Molberg O, Xia J, Fleckenstein B, Khosla C, et al (2004). Antigen Presentation to Celiac Lesion-Derived T Cells of a 33-Mer Gliadin Peptide Naturally Formed by Gastrointestinal Digestion. *J Immunol.*, 173:1757–62. doi: 10.4049/jimmunol.173.3.1757.
- Ramakrishna BS, Makharia GK, Chetri K, et al (2016) Prevalence of adult celiac disease in India: regional variations and associations. *Am J Gastroenterol.*, 111:115–123. doi: 10.1038/ajg.2015.398
- Raptopoulou AP, Bertias G, Makrygiannakis D, et al (2010). The programmed death 1/programmed death ligand 1 inhibitory pathway is up-regulated in rheumatoid synovium and regulates peripheral T cell responses in human and murine arthritis. *Arthritis Rheum.*, 62 (7)1870–1880. doi: 10.1002/art.27500.
- Ravi S, Schilder RJ, Kimball SR (2015). Role of Precursor mRNA Splicing in Nutrient-Induced Alterations in Gene Expression and Metabolism. *J Nutr.*, 145 (5):841–6. doi: 10.3945/jn.114.203216.
- Reid PT, Marsden ME, Cunningham GA, Haslett C, Sallenave JM (1999). Human neutrophil elastase regulates the expression and secretion of elafin (elastase-specific inhibitor) in type II alveolar epithelial cells. *FEBS Lett.*, 457(1):33-7. doi: 10.1016/s0014-5793(99)01004-2.
- Rui Y, Honjo T, Chikuma S (2013). Programmed cell death 1 inhibits inflammatory helper T-cell development through controlling the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110 (40) 16073–16078. doi: 10.1073/pnas.1315828110.
- Rosenblum MD, Olsz E, Woodliff JE, et al (2004). CD200 is a novel p53-target gene involved in apoptosis-associated immune tolerance. *Blood*, 103(7): 2691–8. doi: 10.1182/blood-2003-09-3184.
- Rosenblum MD, Yancey KB, Olsz EB, Truitt RL (2006). CD200, a “no danger” signal for hair follicles. *J. Dermatol. Sci.*, 41:165–174. doi: 10.1016/j.jdermsci.2005.11.003.
- Saheki T, Ito F, Hagiwara H, Saito Y, Kuroki J, Tachibana S, Hirose S (1992). Primary structure of the human elafin precursor preproelafin deduced from the nucleotide

- sequence of its gene and the presence of unique repetitive sequences in the prosegment. *Biochem Biophys Res Commun.*, 185(1):240-245. doi: 10.1016/s0006-291x(05)80981-7. PMID: 1339270.
- Sahler JM, Eade CR, Altier C, March JC (2018). Salmonella Enterica Serovar Typhimurium Increases Functional PD-L1 Synergistically With Gamma Interferon in Intestinal Epithelial Cells Via. *Salmonella Pathogenicity Island 2 Infect Immun.*, 572 86:e00674–17. doi: 10.1128/IAI.00674-17.
- Sakaguchi S (2004). Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual Review of Immunology.*, 22:531-562. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141122.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (1995). Immunologic self- tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of Immunology*, 155:1151-1164.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N (1990). Thymus and autoimmunity: Capacity of the normal thymus to produce pathogenic self-reactive T cells and conditions required for their induction of autoimmune disease. *The Journal of Experimental Medicine*, 172:537-545. doi: 10.1084/jem.172.2.537.
- Salmaninejad A, Khoramshahi V, Azani A, Soltaninejad E, Aslani S, Zamani MR (2018). PD-1 and cancer: molecular mechanisms and polymorphisms. *Immunogenetics*, 70(2):73–86. doi: 10.1007/s00251-017-1015-5.
- Salojin KV, Zhang J, Madrenas J, Delovitch TL (1998) T-cell anergy and altered T cell receptor signaling: Effects on autoimmune disease. *Immunology Today*, 19:468-473. doi: 10.1016/s0167-5699(98)01326-7.
- Salomon B, Bluestone JA (2001). Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol.*, 19:225–52. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.225.
- Sallenave JM, Silva A (1993). Characterization and gene sequence of the precursor of elafin, an elastase-specific inhibitor in bronchial secretions. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 8(4):439-445. doi: 10.1165/ajrcmb/8.4.439. PMID: 8476637.
- Sánchez-León S, Giménez MJ, Comino I, Sousa C, López-Casado MA, Torres MI, et al (2019). Stimulatory Response of Celiac Disease Peripheral Blood Mononuclear Cells Induced by RNAi Wheat Lines Differing in Grain Protein Composition. *Nutrients*, 11(12):2933–48. doi: 10.3390/nu11122933.

- Sansom DM (2000). CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom? *Immunology*, 101(2):169–77. doi: 10.1046/j.1365-2567.2000.00121.x.
- Sarra M, et al (2013). IL-15 positively regulates IL-21 production in celiac disease mucosa. *Mucosal Immunol.*, 6, 244–255. doi: 10.1038/mi.2012.65.
- Scandiuizzi L, Ghosh K, Hofmeyer KA, Abadi YM, Lázár-Molnár E, Lin EY, et al (2014). Tissue-Expressed B7-H1 Critically Controls Intestinal Inflammation. *Cell Rep.*, 6(4):625–32. doi: 10.1016/j.celrep.2014.01.020.
- Schreiner B, Bailey SL, Shin T, Chen L, Miller SD (2008). PD-1 Ligands Expressed on Myeloid-Derived APC in the CNS Regulate T-Cell Responses in EAE. *Eur J Immunol.*, 38(10):2706–17. doi: 10.1002/eji.200838137.
- Schwartz R (1996). Models of T cell anergy: Is there a common molecular mechanism? *The Journal of Experimental Medicine*, 184 (1):1-8. doi: 10.1084/jem.184.1.1.
- Scotti MM, Swanson MS (2016). RNA Mis-Splicing in Disease. *Nat Rev Genet.*, 17(1):19–32. doi: 10.1038/nrg.2015.3
- Seddon B, Mason D (1999). Peripheral autoantigen induces regulatory T cells that prevent autoimmunity. *The Journal of Experimental Medicine*, 189:877-881. doi: 10.1084/jem.189.5.877.
- Shan L, Molberg Ø, Parrot I, et al (2002). Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*, 297: 2275–79. doi: 10.1126/science.1074129.
- Sharma N, Bhatia S, Chunduri V, Kaur S, Sharma S, Kapoor P, Kumari, A, Garg, M (2020). Pathogenesis of celiac disease and other gluten related disorders in wheat and strategies for mitigating. *Them. Front. Nutr.*, 7:6. doi: 10.3389/fnut.2020.00006.
- Sharpe AH, Pauken KE (2018). The Diverse Functions of the PD1 Inhibitory Pathway. *Nat Rev Immunol.*, 18:153–67. doi: 10.1038/nri.2017.108.
- Shaw L, Wiedow O (2011). Therapeutic potential of human elafin. *Biochem. Soc. Trans.*, 39 1450–1454. doi: 10.1042/BST0391450.
- Singh P, Arora A, Strand TA, Leffler DA, Catassi C, Green PH, et al (2018). Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Metaanalysis. *Clin Gastroenterol Hepatol.*, 16(6): 823–836.e2. doi: 10.1016/j.cgh.2017.06.037.
- Simpson AJ, Cunningham GA, Porteous DJ, Haslett C, Sallenave JM (2001). Regulation of adenovirus-mediated elafin transgene expression by bacterial lipopolysaccharide. *Hum Gene Ther.*, 12(11):1395-406. doi: 10.1089/104303401750298553.
- Soliman H, Mediavilla-Varela M, Antonia S (2010). Indoleamine 2,3-dioxygenase: is it an immune suppressor? *Cancer J.*, 16(4): 354–9. doi: 10.1097/PPO.0b013e3181eb3343.

- Sollid LM, Khosla C (2011). Novel therapies for coeliac disease. *J. Intern. Med.*, 269(6):604-613. doi: 10.1111/j.1365-2796.2011.02376.x.
- Sollid LM, Lie BA (2005). Celiac disease genetics: current concepts and practical applications. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 3(9):843-851. doi: 10.1016/s1542-3565(05)00532-x.
- Sollid LM (2002). Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat. Rev. Immunol.*, 2(9):647–55. doi: 10.1038/nri885.
- Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E (1989). Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J Exp Med.*, 169: 345-350. doi: 10.1084/jem.169.1.345
- Song MY, Hong CP, Park SJ, et al (2015). Protective effects of Fc-fused PD-L1 on two different animal models of colitis. *Gut*, 64 (2) 260–271. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307311.
- Sprent J (1995). Central tolerance of T cells. *International Reviews of Immunology*, 13:95-105. doi: 10.3109/08830189509061740.
- Steinert PM, Marekov LN (1995). The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem.*, 270:17702–11. doi: 10.1074/jbc.270.30.17702.
- Steinman R, Hawiger D, Nussenzweig M (2003) Tolerogenic dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, 21:685-711. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141040.
- Tarbell KV, Yamazaki S., Olson K, Toy P, Steinman RM (2004). Cd25+ Cd4+ T Cells, Expanded With Dendritic Cells Presenting a Single Autoantigenic Peptide, Suppress Autoimmune Diabetes. *J Exp Med.*, 199:1467–77. doi: 10.1084/jem.20040180.
- Tejera P, O'Mahony DS, Owen CA, Wei Y, Wang Z, Gupta K, Su L, Villar J, Wurfel M, Christiani DC (2014). Functional characterization of polymorphisms in the peptidase inhibitor 3 (elafin) gene and validation of their contribution to risk of acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 51(2):262–272. doi: 10.1165/rcmb.2013-0238OC.
- Tejera P, Wang Z, Zhai R, Su L, Sheu CC, Taylor DM, Chen F, Gong MN, Thompson BT, Christiani DC (2009). Genetic polymorphisms of peptidase inhibitor 3 (elafin) are associated with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 41(6):696-704. doi: 10.1165/rcmb.2008-0410OC.
- Thorburn CM, Prokunina-Olsson L, Sterba KA, Lum RF., Seldin MF, Alarcón-Riquelme ME, et al (2007). Association of PDCD1 Genetic Variation With Risk and Clinical

- Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus in a Multiethnic Cohort. *Genes Immunol.*, 8:279–87. doi: 10.1038/sj.gene.6364383
- Tong M, Fang X, Yang J, Wu P, Guo Y, Sun J (2020) Abnormal Membrane-Bound and Soluble Programmed Death Ligand 2 (PD-L2). Expression in Systemic Lupus Erythematosus Is Associated With Disease Activity. *Immunol Lett.*, 227:96–101. doi: 10.1016/j.imlet.2020.09.001
- Torres MI, Palomeque T, Lorite P (2015). Celiac Disease and Other Autoimmune Disorders. *InTech*. doi: 10.5772/60695.
- Torres MI, López Casado MA, Ríos A (2007). New aspects in celiac disease. *World J Gastroenterol.*, 13: 1156-1161. doi: 10.3748/wjg.v13.i8.1156.
- Torres MI, López-Casado MA, Lorite P, Ríos A (2007). Tryptophan metabolism and indoleamine 2,3-dioxygenase expression in coeliac disease. *Clin Exp Immunol.*, 148(3):419-24. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03365.x.
- Torres MI, López-Casado MA, Luque J, Peña J, Ríos A (2006). New Advances in Coeliac Disease: Serum and Intestinal Expression of HLA-G. *Int Immunol.*, 18(5):713–8. doi: 10.1093/intimm/dxl008.
- Trynka G, Hunt KA, Bockett NA et al (2011). Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nat Genet.*, 43:1193–1201. doi: 10.1038/ng.998.
- Vader W, Stepniak D, Kooy Y et al (2003). The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten-specific T cell responses. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 100:12390–12395. doi: 10.1073/pnas.2135229100.
- Van Heel DA, Franke L, Hunt KA et al (2007). A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nat Genet.*, 39:827–829. doi: 10.1038/ng2058.
- Verrier T, Solhonne B, Sallenave JM, Garcia-Verdugo I (2012). The WAP protein Trappin-2/Elafin: A handyman in the regulation of inflammatory and immune responses. *Int. J. Biochem.Cell Biol.*, 44, 1377–1380. doi: 10.1016/j.biocel.2012.05.007.
- Vockley CM, Barrera A, Reddy TE (2017). Decoding the role of regulatory element polymorphisms in complex disease. *Curr Opin Genet Dev.*, 43:38–45. doi: 10.1016/j.gde.2016.10.007.
- Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley P.S., Freeman GJ, Green JM, Thompson CB, Bluestone JA (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity.*, 1, 405–413. doi: 10.1016/1074-7613(94)90071-x.

- Wan B, Nie H, Liu A, Feng G, He D, Xu R, et al (2006). Aberrant regulation of synovial T cell activation by soluble costimulatory molecules in rheumatoid arthritis. *J Immunol.*, 177:8844–8850. doi: 10.4049/jimmunol.177.12.8844.
- Wan YY, Flavell RA (2009). How diverse—CD4 effector T cells and their functions. *J. Cell Mol. Biol.*, 1 (1) 20–36. doi: 10.1093/jmcb/mjp001.
- Wehkamp J, Schmid M, Stange EF (2007). Defensins and other antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 23, 370–378. doi: 10.1097/MOG.0b013e328136c580.
- Wiedow O, Schroder JM, Gregory H, Young JA, Christophers E (1990). Elafin: an elastase-specific inhibitor of human skin. Purification, characterization, and complete amino acid sequence. *J Biol Chem.*, 265(25):14791-14795.
- Wieser H, Koehler P (2008). The biochemical basis of celiac disease. *Cereal Chem.*, 85, 1–13. doi: 10.1094/CCHEM-85-1-0001
- Williams SE, Brown TI, Roghanian A, Sallenave JM (2006). SLPI and elafin: One glove, many fingers. *Clin. Sci.*, 110, 21–35. doi: 10.1042/CS20050115.
- Wing K, Sakaguchi S (2010). Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nature Immunology.*, 11(1):7-13. doi: 10.1038/ni.1818.
- Withoff S, Li Y, Jonkers I, Wijmenga C (2016). Understanding Celiac Disease by Genomics. *Trends Genet.*, 32(5): 295–308. doi: 10.1016/j.tig.2016.02.003.
- Wright GJ, Cherwinski H, Foster-Cuevas M, et al (2003). Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200. *J Immunol.*, 171(6): 3034–46. doi: 10.4049/jimmunol.171.6.3034.
- Wright GJ, Puklavec MJ, Willis AC, et al (2000). Lymphoid/neuronal cell surface OX2 glycoprotein recognizes a novel receptor on macrophages implicated in the control of their function. *Immunity.*, 13(2): 233–42. doi: 10.1016/s1074-7613(00)00023-6.
- Yadav M, Stephan S, Bluestone JA (2013). Peripherally induced Tregs—Role in immune homeostasis and autoimmunity. *Frontiers in Immunology*, 4:232. doi: 10.3389/fimmu.2013.00232.
- Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, Matsuda H, Aoki M, Tanno Y, et al (2002). Expression of Programmed Death 1 Ligands by Murine T Cells and APC. *J Immunol.*, 169:5538–45. doi: 10.4049/jimmunol.169.10.5538.
- Yi JS, Du M, Zajac AJ (2009). A vital role for interleukin-21 in the control of a chronic viral infection. *Science*, 324(5934):1572-6. doi: 10.1126/science.1175194.

- Zani ML, Nobar SM, Lacour SA, Lemoine S, Boudier C, Bieth JG, Moreau, T (2004). Kinetics of the inhibition of neutrophil proteinases by recombinant elafin and pre-elafin (trappin-2) expressed in *Pichia pastoris*. *European Journal of Biochemistry*, 271, 2370–2378. doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04156.x.
- Zhang X, Schwartz JC, Guo X, Bhatia S, Cao E, Lorenz M, Cammer M, Chen L, Zhang ZY, Edidin MA (2004). Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1. *Immunity*, 20:337–347. doi: 10.1016/s1074-7613(04)00051-2.
- Zhang Q, Vignali DA (2016). Co-stimulatory and Co-inhibitory pathways in autoimmunity. *Immunity*, 44 (5) 1034–1051. doi:10.1016/j.immuni.2016.04.017.

APORTACIONES CIENTÍFICAS

ARTÍCULO 1

1. Referencia:

Dysregulation of the PD-1/PD-L1 pathway contributes to the pathogenesis of celiac disease.

- Ponce de León, Candelaria
- Ángel López-Casado, Miguel
- Lorite, Pedro
- Palomeque, Teresa
- Isabel Torres, María

doi: 10.1038/s41423-019-0256-7

2. Breve resumen

En este estudio, nos centramos en la alteración de la vía de la muerte celular programada 1 (PD-1)/PD-L1 en la enfermedad celíaca (EC). Se analizó la expresión de los antígenos PD-1 y PD-L1 en las biopsias de intestino, evaluamos las frecuencias de células T PD-1 positivas mediante análisis de citometría de flujo y determinaron los niveles séricos de sPD-1 y sPD-L1 mediante ELISA en pacientes con EC activa. Nuestros resultados proporcionaron la primera evidencia de altos niveles de expresión de PD-L1 en pacientes celíacos y una expresión negativa de PD-1 en muestras intestinales de pacientes con EC activa. Por otro lado, obtuvimos un resultado negativo en las frecuencias de células T CD8+/PD-1+ y las frecuencias de las células T CD4+/PD-1+ en el grupo de EC fueron muy bajas. Por último, se observó que los niveles de sPD-1 y sPD-L1 eran considerablemente más elevados en el suero de los pacientes con EC que en el de los controles sanos. Estos hallazgos sugirieron que en pacientes con EC existe una expresión de PD-1 desregulada en células T aunque se desconoce con certeza qué factor o factores contribuyen sugiere un papel importante de la vía PD-L1: PD-1 en la regulación de la tolerancia de la mucosa *in situ*.

3. **Fecha de publicación:** 26 de junio de 2019
4. **Estado:** Publicado
5. **Tipo de publicación:** Artículo original
6. **Categoría:** Correspondencia

7. **Ubicación:** Departamento de Biología Experimental, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén.
8. **Otros datos de interés:** Factor de impacto: 8.48. Primer decil. Inmunología.

ARTÍCULO 2

1. Referencia:

Significance of PD-1 Alternative Splicing in Celiac Disease as a Novel Source for Diagnostic and Therapeutic Target.

- Ponce de León, Candelaria
- Lorite, Pedro
- López-Casado Miguel Ángel
- Barro Losada, Francisco
- Palomeque, Teresa
- Torres, María Isabel

doi: 10.3389/fimmu.2021.678400

2. Breve resumen

En este estudio nos centramos en la alteración de la vía PD-1/PD-L1 en la enfermedad celíaca (EC) y discutimos las funciones de la vía PD-1 en la regulación de la respuesta inmunitaria. Exploramos la idea de que la alteración del proceso de empalme del ARNm en proteínas reguladoras clave podría representar una fuente novedosa para identificar dianas diagnósticas, pronósticas y terapéuticas en la EC. Caracterizamos el perfil de las variantes de ARNm de PD-1 en pacientes con EC y en respuesta a la incubación de péptidos de gluten tras experimentos *in vitro*. Se aisló el ARN de sangre total y se amplificó la región codificante del ARNm de PD-1 humano mediante PCR de ADNc. La amplificación por PCR de la secuencia codificante del PD-1 humano reveló una asociación entre la sobreexpresión de la proteína sPD-1 y el transcrito PD-1 $\Delta 3$ en la enfermedad celíaca. Así, encontramos tres nuevas isoformas, dos de las cuales dan lugar a una proteína truncada y la otra isoforma con una pérdida de 14 aa del exón 2 y el exón 3 completo ($\Delta 3$) que podría codificar una nueva forma soluble de PD-1 (sPD-1). Nuestro estudio aportó que el gluten dietético puede modular procesos necesarios para la

homeostasis celular a través del empalme alternativo del pre-ARNm que codifican proteínas reguladoras clave, lo que representa un mecanismo adaptativo en respuesta a diferentes condiciones nutricionales.

3. **Fecha de publicación:** 16 de junio de 2021
4. **Estado:** Publicado
5. **Tipo de publicación:** Artículo original
6. **Categoría:** Artículo de revista
7. **Ubicación:** Departamento de Biología Experimental, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén.
8. **Otros datos de interés:** Índice de impacto: 8.78; Primer cuartil. Inmunología.

ARTÍCULO 3

1. Referencia:

Expression of elafin and CD200 as immune checkpoint molecules involved in celiac disease.

- Ponce de León Collado, Candelaria
- Ángel López-Casado, Miguel
- Lorite, Pedro
- Palomeque, Teresa
- Isabel Torres, María

International Journal of Molecular Sciences 2023 (Int J Mol Sci.)

2. Breve resumen

Existen pocos datos relacionados con la expresión o función de la vía CD200/CD200R y elafin en la enfermedad celíaca (EC) y hemos discutido su papel en la regulación de la respuesta inmunitaria. Se determinó la distribución de CD200, CD200R y elafin mediante ELISA en suero y en biopsias mediante el análisis inmunohistoquímico de pacientes con EC. Además, se realizó el análisis de citoquinas Th1 y Th17 por ELISA y el genotipado de SNPs de PI3 por PCR, sometiéndose a un análisis RFLP para su detección. Obtuvimos un nivel significativamente

mayor de sCD200, sCD200R y una menor expresión de elafin en suero de pacientes con EC en comparación con los controles sanos. En consonancia con nuestros resultados, la expresión de CD200 está regulada por IFN- γ y la interacción de CD200/CD200R conduce a la producción de citoquinas tipo Th1 y Th17. En relación con PI3, la proporción del genotipo CT del SNP rs1733103 y el genotipo GG del SNP rs41282752 fueron predominantes en los pacientes con EC. El SNP rs1733103 mostró una asociación significativa entre los SNPs y la EC. Por lo tanto, los puntos de control inmunitarios están comprometidos o desregulados, y pueden contribuir a la inflamación y al proceso de autoinmunidad. Las variantes de empalme del gen PI3 predisponen a la proteína elafin a modificar su expresión y función, lo que resulta en una reducción de los niveles funcionales diferenciales de la proteína en pacientes con enfermedad celíaca activa.

3. Fecha de publicación: -

4. Estado: Enviado

5. Tipo de publicación: Artículo original

6. Categoría: Artículo de revista

7. Ubicación: Departamento de Biología Experimental, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén.

8. Otros datos de interés: Índice de impacto: 2.87. Segundo tercil. Inmunología.

ARTÍCULO 4

1. Referencia:

Physiology and Pathology of Immune Dysregulation: Regulatory T Cells and Anergy.

- Torres, María Isabel
- López-Casado Miguel Ángel
- Ponce de León, Candelaria
- Lorite, Pedro
- Palomeque, Teresa

doi: 10.5772/intechopen.71770

2. Breve resumen

El sistema inmunitario es responsable de la defensa del organismo. Controla lo que se introduce en él y lo identifica como propio de lo que no lo es. Los mecanismos defensivos activados por el sistema inmunitario se dirigen contra microbios patógenos y proteínas tóxicas o alergénicas, y debe evitar respuestas que produzcan un daño excesivo de los tejidos propios, induciendo tolerancia para evitar la autoinmunidad y otras inmunopatologías. Las células T reguladoras (T_{REG}) desempeñan un papel esencial en estos procesos activos, utilizando varios mecanismos supresores distintos. Las enfermedades con desregulación inmune son el resultado de defectos que afectan al desarrollo y/o la función de las células T_{REG}, incluido el impacto de mutaciones de genes esenciales para las funciones de las células T_{REG} y los síndromes autoinmunes asociados.

3. **Fecha de publicación:** 20 de diciembre de 2017
4. **Estado:** Publicado
5. **Tipo de publicación:** Revisión
6. **Categoría:** Capítulo de libro
7. **Ubicación:** Departamento de Biología Experimental, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén.
8. **Otros datos de interés:** 1.797 descargas del capítulo de libro, 3 citaciones.

ARTÍCULO 5

1. Referencia:

Celiac Disease Autoimmunity.

- López-Casado Miguel Ángel
- Ponce de León, Candelaria
- Lorite, Pedro
- Palomeque, Teresa
- Torres, María Isabel

doi: 10.1007/s00005-018-0520-z

2. Breve resumen

La celiaquía es una enfermedad autoinmune desencadenada por la ingestión de gluten, la fracción proteica del trigo, la cebada y el centeno. No es simplemente una enfermedad intestinal; es multifactorial, causada por muchos factores genéticos diferentes que actúan junto con causas no genéticas. Al igual que otras enfermedades autoinmunes, la celiaquía es un trastorno poligénico en el que el locus del complejo mayor de histocompatibilidad es el factor genético más importante, y es el resultado de una respuesta inmunitaria a autoantígenos que conduce a la destrucción de tejidos y a la producción de autoanticuerpos. La celiaquía ejemplifica cómo una enfermedad puede tener características similares a las autoinmunes teniendo que ser impulsada por un antígeno exógeno y cómo puede considerarse razonablemente como un modelo de autoinmunidad órgano-específica.

3. **Fecha de publicación:** 25 de agosto de 2018
4. **Estado:** Publicado
5. **Tipo de publicación:** Editorial
6. **Categoría:** Artículo de revista
7. **Ubicación:** Departamento de Gastroenterología Pediátrica, Hospital Virgen de las Nieves, Granada; Departamento de Biología Experimental, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén.
8. **Otros datos de interés:** Índice de impacto: 2.87. Segundo tercil. Inmunología.

ANEXOS

Material suplementario - Artículo 2

EXON 1

PD1_gene ACAGTTTCCCTTCCGCTCACCTCCGCTGAGCAGTGGAGAAGGCGGCACTCTGGTGGGGC

PD1_gene TGCTCCAGGCATGCAGATCCACAGGCGCCCTGGCCAGTCGTCTGGGCGGTGCTACAAC

PD1-F primer **GCGGCCAGGATGGTTCTTA** -> **INTRON 1**

PD1_gene GGGCTGGCGGCCAGGATGGTTCTTAGGTAGGTGGGGTCGGCGGTCAGGTGTCCAGAGCC

Full 687 bp GCGGCCAGGATGGTTCTTAG

Full* 781 pb GCGGCCAGGATGGTTCTTAG

Full* 715 pb GCGGCCAGGATGGTTCTTAG

Δ2 327 bp GCGGCCAGGATGGTTCTTAG

Δ3 531 bp GCGGCCAGGATGGTTCTTAG

Δ3* 489 bp GCGGCCAGGATGGTTCTTAG

Δ2,3 171 bp GCGGCCAGGATGGTTCTTAG

PD1_gene AGGGGTCTGGAGGGACCTTCCACCCTCAGTCCCTGGCAGGTCGGGGGTGCTGAGGCGGG

PD1_gene CCTGGCCCTGGCAGCCCAGGGGTCCCGGAGCGAGGGGTCTGGAGGGACCTTTCACCTCTCA

PD1_gene GTCCCTGGCAGGTCGGGGGTGCTGTGGCAGGCCAGCCTTGGCCCCAGCTCTGCCCT

PD1_gene TACCCTGAGCTGTGTGGCTTTGGGCAGCTCGAACTCCTGGGTTCTCTCTGGGCCCCAAC

PD1_gene TCCTCCCTGGCCCAAGTCCCCTCTTTGCTCCTGGGCAGGACAGGACCTCTGTCCCCTCTC

PD1_gene AGCCGGTCCCTGGGGCTGCGTGTCTGTAGAAATGACGGGTCAGGCTGGCCAGAACCCCA

PD1_gene AACCTTGGCCGTGGGGAGTCTGCGTGGCGGCTCTGCCTTGCCAGGCATCCTTGGTCTC

PD1_gene ACTCGAGTTTTCTAAGGATGGGATGAGCCCCATGTGGGACTAACCTTGGCTTTACGACG

PD1_gene TCAAAGTTTAGATGAGCTGGTGATATTTTCTCATTATATCCAAAGTGACCTGTTTCGAG

PD1_gene TGAGGACAGTTCTTCTGTCTCCAGGATCCCTCCTGGGTGGGGATTGTGCCCGCCTGGGTC

PD1_gene TCTGCCAGATTCCAGGGCTCTCCCCAGCCCTGTTTCAGACCATCCGTGGGGAGGCTT

PD1_gene GGCCTCACTCTCCCGGATCGAGGAGAGAGGGAGCCTCTTCTGGGCTGCCCGTGACCTG

PD1_gene GGCCTCTGTGTACTGTGACCACAGCCGCTCCTGGACCCTCTGTGCCCGGCTGGCCC

PD1_gene TCTGTGCCAGCCAGCCTGCACCTGGGGATGCCAAGCCCTGGGGAGGTTGTTTACCCA

PD1_gene GGCCAAGCCTAAGACAGTCCCTCTGGGCCCTGCTGGGTACCGGGTGTGACACCACTGGG

PD1_gene AGGACAAGATGAGGGGCACCCCTGGGGCCGCTGACACCCCTCGAGGCTCCTGCCCCG

PD1_gene GGGGTCTGGTGGCCCTTCACTGTGGCAGGCGACTGGGGTTCCCCACCTGGCCCCCTCT

PD1_gene CCGGGGCTGCTCCCCGCACCTGAGGCAGCATCCTTGTGAGGGCGTGCCTTCCTGCC

PD1_gene TCAGCGCCACCTCTTAAGGTTGGCCGTGGGTCACCTCAGGACTCAGAACTGGAGATTCTG

PD1_gene GGCAAAGGCAAAGAGCAAAGGGCAAAGGCATCCAGGGAGACGACTGCGGGGGAACC

PD1_gene AGAGGGCAGAGGGCGCTCGTCACAGGGAGGGGAGCTGAGCGAGGCAGGAGGGAGCC

PD1_gene GAGCCTCTCCCCCGTGTCCGGCTTTCAGGCACGCCCTCGGACGCCACCTCCCCGA

PD1_gene CCCAGGCGGAAAGATAAGAGCAAGGTGTCCGCAGCCTGACACTCGTGCCCTCAGGTGCC

PD1_gene GCGCTTGTGCCGACAAGACTCTCACAGGTGGCATGCCTCGGTTTCCCCACTGGTAACAG

PD1_gene CACAGGGCACTCAGCAAGGCGCAGTGGGCATGACTGGGGTCTGTGGGTCTGACCCAGA
PD1_gene TGTGGCCACCCCGGCGCAGTGGTCTTCATTCCAGGATGCCTCTTTCCCTCCTGATCTA
PD1_gene TTCACTGCGTTCCGCATTTCGGTCATTCCCGGGCCACCACTCCACCTCAGGTGTGTGCT
PD1_gene TCCTTGTGTTTTATGAGATATCCCAACCCGGCTGCTTATTGGCCCCGTCGAGGGCAG
PD1_gene GAGCATAAATAAGAGCCTCTGCTTTGGCGTGGGACCACTGTGAGCTCCAGTCAGCGCTGC
PD1_gene CACTGCTGAGCTCTGGGCCTTCGACAGGACTTGGCCCCTTACTGACTTCTCCGTGTGCTT
PD1_gene TGGGTCATGGGTGAGGACGCCTCCTGGCAAGGCTGCGTCCTGAGGATTAATCGGGTCAT
PD1_gene CTGTGAAACTACCCAGCCCAGCCCCTGACACTTTTTTGTGTTTCTTTTAGTGACAGG
PD1_gene GTCTTGCTCTGTACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGTGTGATCTCGGCTCACTCGACCTCCG
PD1_gene GGGCTCAAGCAATTCTCCACCTCTGCCTCCAGAGTAGCTGGGACTATAGGCACGTGCCA
PD1_gene CCCTGCCAGGCTAATTTCTCCATTTTTTTTAGAGACAGGGTCTCGTATGTTCCCCAGG
PD1_gene CTGGGCTCAAATGGTCTCCACCTCAGCCTCCCAAGTACTGGGATTACAGGCATAAGC
PD1_gene CACTGCATCTGGCCTCCATGACACATATTTTTAAAGTCTGATTTTTAAAGTCAAACCTTT
PD1_gene GAAGTCAGATTTTAAACGGACTATTTTGAAAAATATACAAAAACGTTTAAAAACAATGAA
PD1_gene TATCCCTCACCTAGAATCAATAACTAAGAATATTGACACATTTGCTTTGGGGACTGGGCG
PD1_gene GCTGGAGCTGCCATGACAAAGCTCCGCCGACCGAGTGGCTTTTAAACAGAGCCTGCCCTC
PD1_gene TCGCCGACTGAGGGCTGGACGTGCAGGATGGAGCTCCGCAGGGTCGGCTCCCTGTGCTC
PD1_gene TGAGGGGCTCTGCTCAGCCTCTCCCGCTGTGGCTTAAAAACAGAGCCTGTCTCCCGCC
PD1_gene GTGGGGGGCTGGACATGCAGGACCGAGGGGCCACAGGGTCGGCTCCCTGTGCTCCGAGAG
PD1_gene GGCTCTGCTCAGCTTCTCCTGGCTGGGGGGTTTTGTGGCCACCCTCTGTGTTCTGGGTT
PD1_gene CAGAAGCATCCCCAGGCTCTGCCTTCATCTCTGCACGGGTGACTCTGTACAGGAAGCCA
PD1_gene GGCTGTGGTCAATGGCCACCCAGCCCTGTGCCCTCATCTTACCTAGTCCCAGCTGCCG
PD1_gene TCACCCTATTCTAATAAGGCCGCCTTCTGAGGTCATGGGGTTAGGACTTCCACATAGGA
PD1_gene ATCTGTGGGGACACGGTTTCGGCCACAGCCCTTCCACCTCCACACACACACAGACTGT
PD1_gene GAGGAGTTGGAAGACCTCACTCCTCACCCCTGCCAGTCTCTAGGGACAAGCTCGCTGT
PD1_gene CCTCATCCCAGCACAGCCGTGGGACGGTTTCTTGTCCCTAATGGGACCACGGTCAGAG
PD1_gene ATGCCGGTCTGGTCTGGGCCAGCAGGTTCTCCGCCGGGGCAGGCAGCCTTCTTCTGT
PD1_gene GCGCTTCTGGAAAGCAATGTCTGTAATGCGGTCTCTCTGCGGGAGCACCCCCACCGCCA
PD1_gene CCTCACAGGCTGTTCACAGCCCCGGATGGGCTCTGTCTCCCTCCTGACCCTGCATAG
PD1_gene GGCACAGCCCTCTCTCATCAACCCACGATCTTACGTGGATCCGAGAGGGAGCACCTGGGG
PD1_gene AAACAATGGAATCCCATAGAAAACCCCAAATCTAACTTGATCCAGGACCAGCCAGTGGT
PD1_gene CACTTCTGAATATTCACCTTCTTAGTAGACTACCAGCCAAGGGAGGCCAGGAAGCCTT
PD1_gene CCTGGAGGAGGTGGCCTGAGGACTGGGGTGGGCAGGCCCTGCGTGGGGTCCGCCACCCA
PD1_gene GCACCCACACTGGGTGGGAGCCAGTCTCTGAGACTGGCTGGGGGAGGTGGGAGAGGGG

PD1_gene GCTGCTTGAAGTGCAGACACCGAGGTCTAGCCCCACCCACCCAGCCAGTTGGTGGAGG
PD1_gene CAGGGGAGGCCGAGGGGCCAGCTGGACCTGCTCCCCGGGTGGATTCCAAAATAGGGGG
PD1_gene GTTGGGGGGGGCGGAACAGGAGCCCAGGGTCTGGCTTGAGGCCAGTGGCTGAGGGCTG
PD1_gene GTGCAAGCCAGACAGGAAAAGGGTTGAGCCTGTCAGCGCCAGCACAGATCAAGTCAGGAG
PD1_gene CAGGTCCCTCCACCAATGTGTGCAAATAAATAGCAGCTAAGTTTCCAGTTACAAGAACAA
PD1_gene TGCACAGATGGTCCCAGGGACATTGCGGTGTGGACACACAGCGGCCATTGTCTCTGTCGCC
PD1_gene AGCACCTCGCCCTACAGCTGGGGGTCCCTTAGCACTTCCCTAGCCATGCAGGGTCCCTGC
PD1_gene TCACAGTACCCGTGATGACTTCTGTTCCTCACCTGCCTGTCTGTCCCGACAGCTGCATGG
PD1_gene CAGCCCTGGCCTGGGAGATGGAGACCCCGAGGGGCTGCCTGCGGTGGTGGGGCCCTGGG
PD1_gene TCCCCACTGCATTCCCAGAAACCCAGAGGGCAGGGCATTTCCTGCTCTGTGCCGAGTC
PD1_gene CACCCAGCCCCAGCTAGGCCAGTAAGGGCTGCAGCCACCCCTGTCCCAGGCTGCCTCC
PD1_gene CAGGAGCCCTCTGGCCCTGATGCCAGAAGCCATCTTCCTCCATTAGGCAGGTCTCTG
PD1_gene AGTGCCTTGGCCTGGCTGCCTGCTGGCCCTGAGAGTCACACTACCCACAGCCCTCCTTG
PD1_gene GTCAAAATCCACTCTGGAGTGGCTGGAAGATTCCCCGGGCCACGCCGACACGCCTATG
PD1_gene CAGGGAGCTTCCCTGGCCGGCCGGCAGACAAAGGGCGGTCTCAGAGAGGGGGCTCACCTC
PD1_gene AGCAGCCCTTGTGTAGCTGGCCCTCGCCCTGCCACCTCTGGGAACACCACAGGAAGC
PD1_gene TGGGGACAGGCACGCAGGTGAAGGAGCGAGCGCTTGTCAGCCGGGAGGCCATGGGCAC
PD1_gene AGAGGGAACAGGGACACCCCTGGGTGGCCTCAAGGTCACCTCAAACCCCTCACTCGTCCCC
PD1_gene TGGGAGGGTGGCCAGTGAGGTTGGCACTAGGAGTTGGTCTGGTACATGACAGACCCAC
PD1_gene CCACCTCTGGTGTCCAGCCAGCACGCCGTGGGCCAGCCTGGCTGCAGGGACACAGGGGCA
PD1_gene GCAGCCCCCTCCTCTGAGCTGGTTGCTCCTTGAGTCATCACACCCTGCCACGGA
PD1_gene GGCCGCTGTCCCAGGAAGCAGAGGGACCGCAGCTGTGGCAACCAGGGCCTGGTCTCTGT
PD1_gene GTCACCTCGCTGGGGGGCCGTGCCAGGCCTGAGACGGAAGTGTGACAGTGCCTGGG
PD1_gene TCTGACAGTGTGGGGCTGGCGCCATGTTTGGGGAACCTGTGGCATGGGACCTGTGGGTG
PD1_gene AGCCGGGAAAATCACCCCTGTCATGGCATCTCGGGCCTGGATCTTAAGCGCCTGTGTTG
PD1_gene GTGCCTCCGCTGGCGGAAGAGCCGACCCACGTTGCCATGCGGGTATCCCAAGCCC
PD1_gene TGACCCTGGCAGGCATATGTTTCAGGAGGTCCTTGTCTTGGGAGCCAGGGTCGGGGGCC
PD1_gene CCGTGTCTGTCCACATCCGAGTCAATGGCCATCTCGTCTCTGAAGCATCTTTGCTGTGA
PD1_gene GCTCTAGTCCCCACTGTCTTGTGGAAAATGTGGAGGCCCACTGCCACTGCCAGGGC
PD1_gene AGCAATGCCCATACCACGTGGTCCCAGCTCCGAGCTTGTCTGAAAAGGGGGCAAAGACT
PD1_gene GGACCCTGAGCCTGCCAAGGGGCCCACTCCTCCCAGGGCTGGGGTCTCCATGGGCAGCC
PD1_gene CCCCACCCACCCAGACCAGTTACTTCCCCTGTGCCAGAGCAGTGCAGACAGGACCAGGC
PD1_gene CAGGATGCCCAAGGGTCAAGGGGCTGGGGATGGGTAGCCCCAAACAGCCCTTTCTGGGGG
PD1_gene AACTGGCCTCAACGGGGAAGGGGTGAAGGCTCTTAGTAGGAAATCAGGGAGACCCAAGT

PD1_gene CAGAGCCAGGTGCTGTGCAGAAGCTGCAGCCTCACGTAGAAGGAAGAGGCTCTGCAGTGG
 PD1_gene AGGCCAGTGCCCATCCCCGGGTGGCAGAGGCCCCAGCAGAGACTTCTCAATGACATTCCA
 PD1_gene GCTGGGGTGGCCCTTCCAGAGCCCTTGCTGCCCGAGGGATGTGAGCAGGTGGCCGGGGAG

EXON 2

PD1_gene GCTTTGTGGGGCCACCCAGCCCTTCCCTCACCTCTCTCCATCTCTCAGACTCCCCAGACA
 Full 687 bp ACTCCCCAGACA
 Full* 781 pb ACTCCCCAGACA
 Full* 715 bp ACTCCCCAGACA
 Δ3 531 bp ACTCCCCAGACA
 Δ3* 489 bp

PD1_gene GGGCCTGGAAACCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACG
 Full 687 bp GGGCCTGGAAACCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACG
 Full* 781 pb GGGCCTGGAAACCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACG
 Full* 715 bp GGGCCTGGAAACCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACG
 Δ3 531 bp GGGCCTGGAAACCCCCACCTTCTCCCCAGCCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAAGG
 Δ3* 489 bp CCCTGCTCGTGGTGACCGAAGGGGACAACG

PD1_gene CCACCTTCACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCA
 Full 687 bp CCACCTTCACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCA
 Full* 781 pb CCACCTTCACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCA
 Full* 715 bp CCACCTTCACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCA
 Δ3 531 bp CCACCTTCACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCA
 Δ3* 489 bp CCACCTTCACCTGCAGCTTCTCCAACACATCGGAGAGCTTCGTGCTAAACTGGTACCGCA

PD1_gene TGAGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCCCG
 Full 687 bp TGAGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCCCG
 Full* 781 pb TGAGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCCCG
 Full* 715 bp TGAGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCCCG
 Δ3 531 bp TGAGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCCCG
 Δ3* 489 bp TGAGCCCCAGCAACCAGACGGACAAGCTGGCCGCCTTCCCCGAGGACCGCAGCCAGCCCG
 Δ2,3 171 bp

PD1_gene GCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAACCTGCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCG
 Full 687 bp GCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAACCTGCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCG
 Full* 781 pb GCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAACCTGCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCG
 Full* 715 bp GCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAACCTGCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCG
 Δ3 531 bp GCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAACCTGCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCG
 Δ3* 489 bp GCCAGGACTGCCGCTTCCGTGTCACACAACCTGCCAACGGGCGTGACTTCCACATGAGCG

PD1_gene TGGTCAGGGCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTGGGGCCATCTCCCTGGCCC
 Full 687 bp TGGTCAGGGCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTGGGGCCATCTCCCTGGCCC
 Full* 781 pb TGGTCAGGGCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTGGGGCCATCTCCCTGGCCC
 Full* 715 bp TGGTCAGGGCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTGGGGCCATCTCCCTGGCCC
 Δ3 531 bp TGGTCAGGGCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTGGGGCCATCTCCCTGGCCC
 Δ3* 489 bp TGGTCAGGGCCCGGCGCAATGACAGCGGCACCTACCTCTGTGGGGCCATCTCCCTGGCCC

INTRON 2

PD1_gene CCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGGCAGAGCTCAGGGTGACAGGTGCGGCCTCGG
 Full 687 bp CCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGGCAGAGCTCAGGGTGACAG
 Full* 781 pb CCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGGCAGAGCTCAGGGTGACAG
 Full* 715 bp CCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGGCAGAGCTCAGGGTGACAGGTGCGGCCTCGG
 Δ3 531 bp CCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGGCAGAGCTCAGGGTGACAG
 Δ3* 489 bp CCAAGGCGCAGATCAAAGAGAGCCTGCGGGCAGAGCTCAGGGTGACAG

PD1_gene AGGCCCGGGGACAGGGTGAGCTGAGCCGGTCTGGGGTGGGTGTCCCCTCTGCACAGG
 Full* 715 bp **AGGCCCGGGGCA**

PD1_gene ATCAGGAGCTCCAGGGTCGTAGGGCAGGGACCCCCAGCTCCAGTCCAGGGCTCTGTCTT

PD1_gene GCACCTGGGGAATGGTGACCGGCATCTCTGTCTCTAGCTCTGGAAGCACCCAGCCCT

PD1_gene CTAGTCTGCCCTCACCCCTGACCCTGACCCTCCACCCTGACCCCGTCTAACCCCTGACC

EXON 3

PD1_gene TTTGTGCCCTTCCAGAGAGAAGGGCAGAAGTGCCACAGCCACCCAGCCCTCACCCA
 Full 687 bp AGAGAAGGGCAGAAGTGCCACAGCCACCCAGCCCTCACCCA
 Full* 781 pb AGAGAAGGGCAGAAGTGCCACAGCCACCCAGCCCTCACCCA
 Full* 715 bp **CAG**AGAGAAGGGCAGAAGTGCCACAGCCACCCAGCCCTCACCCA
 Δ2 327 bp AGAGAAGGGCAGAAGTGCCACAGCCACCCAGCCCTCACCCA

PD1_gene GGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTGGTGGTTGGTGTGCTGGGCGGCCTGCTGGGCAGCC
 Full 687 bp GGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTGGTGGTTGGTGTGCTGGGCGGCCTGCTGGGCAGCC
 Full* 781 pb GGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTGGTGGTTGGTGTGCTGGGCGGCCTGCTGGGCAGCC
 Full* 715 bp GGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTGGTGGTTGGTGTGCTGGGCGGCCTGCTGGGCAGCC
 Δ2 327 bp GGCCAGCCGGCCAGTTCCAAACCCTGGTGGTTGGTGTGCTGGGCGGCCTGCTGGGCAGCC

INTRON 3

PD1_gene TGGTGCTGCTAGTCTGGGTCTGGCCGTCATCTGCTCCCGGGCCGCACGAGGTAACGTCA
 Full 687 bp TGGTGCTGCTAGTCTGGGTCTGGCCGTCATCTGCTCCCGGGCCGCACGAG
 Full* 781 pb TGGTGCTGCTAGTCTGGGTCTGGCCGTCATCTGCTCCCGGGCCGCACGAG
 Full* 715 pb TGGTGCTGCTAGTCTGGGTCTGGCCGTCATCTGCTCCCGGGCCGCACGAG
 Δ2 327 bp TGGTGCTGCTAGTCTGGGTCTGGCCGTCATCTGCTCCCGGGCCGCACGAG

PD1_gene TCCCAGCCCTCGGCCTGCCCTGCCCTAACCCCTGCTGGGCGCCCTCACTCCCGCCTCCCC

PD1_gene TTCCTCACCCCTTCCCTCACCCACCCACCTCCCCCATCTCCCCGCCAGGCTAAGTCC
 Full-781-pb **CTAAGTCC**

PD1_gene CTGATGAAGGCCCTGGACTAAGACCCCCACCTAGGAGCACGGCTCAGGGTCGGCCTGG
 Full-781-pb **CTGATGAAGGCCCTGGACTAAGACCCCCACCTAGGAGCACGGCTCAGGGTCGGCCTGG**

EXON 4

PD1_gene TGACCCCAAGTGTGTTTCTCTGCAGGGACAATAGGAGCCAGGCGCACCCGGCCAGCCCTG
 Full 687 bp GGACAATAGGAGCCAGGCGCACCCGGCCAGCCCTG
 Full* 781 pb **TGACCCCAAGTGTGTTTCTCTGCAG**GGACAATAGGAGCCAGGCGCACCCGGCCAGCCCTG
 Full* 715 bp GGACAATAGGAGCCAGGCGCACCCGGCCAGCCCTG
 Δ2 327 bp GGACAATAGGAGCCAGGCGCACCCGGCCAGCCCTG
 Δ3 531 bp GGACAATAGGAGCCAGGCGCACCCGGCCAGCCCTG
 Δ3* 489 bp GGACAATAGGAGCCAGGCGCACCCGGCCAGCCCTG
 Δ2,3 171 bp GGACAATAGGAGCCAGGCGCACCCGGCCAGCCCTG

INTRON 4

PD1_gene GTGAGTCTCACTCTTTTCTGCATGATCCACTGTGCCTTCCTTCTGGGTGGGCAGAGGT

PD1_gene GGAAGGACAGGCTGGGACCACACGGCCTGCAGGACTCACATTCTATTATAGCCAGGACCC

PD1_gene CACCTCCCCAGCCCCAGGCAGCAACCTCAATCCCTAAAGCCATGATCTGGGGCCCCAGC

PD1_gene CCACCTGCGGTCTCCGGGGGTGCCCGGCCATGTGTGTGCTGCTGCGGTCTCCAGGGG

PD1_gene TGCTTGGCCACGCGTGTGCCCGCCTGCGGTCTCTGGGGGTGCCCGGCCACATATGTGC

PD1_gene CTGCTGCGGTCTCCAGGTGTGCCCGGCCATGCGTGTGCCACCTGCGAGGGCGTGGGG

PD1_gene TGGGCTTGGTCATTTCTTATCTTACATTGGAGACAGGAGCTTGAAAAGTACATTTTG

PD1_gene GAATCCTAAATCTGCAAGAATGCCAGGGACATTTAGAGGGGGACATTGAGCCAGAGAGG

PD1_gene AGGGGTGGTGTCCCCAGATCACACAGAGGGCAGTGGTGGGACAGCTCAGGGTAAGCAGCT

PD1_gene CATAGTGGGGGGCCAGGTTCCGGTGCCGGTACTGCAGCCAGGCTGTGGAGCCGGGGCT

EXON 5

PD1_gene CCTTCCTGCGGTGGGCCGTGGGGCTGACTCCCTCTCCCTTTCTCCTCAAAG AAGGAGGAC
 Full 687 bp AAGGAGGAC
 Full* 781 pb AAGGAGGAC
 Full* 715 bp AAGGAGGAC
 Δ2 327 bp AAGGAGGAC
 Δ3 531 bp AAGGAGGAC
 Δ3* 489 bp AAGGAGGAC
 Δ2,3 171 bp AAGGAGGAC

PD1_gene CCTCAGCCGTGCCTGTGTTCTCTGTGGACTATGGGGAGCTGGATTCCAGTGGCGAGAG
 Full 687 bp CCTCAGCCGTGCCTGTGTTCTCTGTGGACTATGGGGAGCTGGATTCCAGTGGCGAGAG
 Full* 781 pb CCTCAGCCGTGCCTGTGTTCTCTGTGGACTATGGGGAGCTGGATTCCAGTGGCGAGAG
 Full* 715 bp CCTCAGCCGTGCCTGTGTTCTCTGTGGACTATGGGGAGCTGGATTCCAGTGGCGAGAG
 Δ2 327 bp CCTCAGCCGTGCCTGTGTTCTCTGTGGACTATGGGGAGCTGGATTCCAGTGGCGAGAG
 Δ3 531 bp CCTCAGCCGTGCCTGTGTTCTCTGTGGACTATGGGGAGCTGGATTCCAGTGGCGAGAG
 Δ3* 489 bp CCTCAGCCGTGCCTGTGTTCTCTGTGGACTATGGGGAGCTGGATTCCAGTGGCGAGAG
 Δ2,3 171 bp CCTCAGCCGTGCCTGTGTTCTCTGTGGACTATGGGGAGCTGGATTCCAGTGGCGAGAG

<- **AGGGACTCGTCTGCCTCAT** PD1-R primer

PD1_gene AAGACCCCGAGCCCCCGTGCCTGTGTCCCTGAGCAGACGGAGTATGCCACCATTGTC
 Full 687 bp AAGACCCCGAGCCCCCGTGCCTGTGTCCCTGAGCAGACGGAGTA
 Full* 781 pb AAGACCCCGAGCCCCCGTGCCTGTGTCCCTGAGCAGACGGAGTA
 Full* 715 bp AAGACCCCGAGCCCCCGTGCCTGTGTCCCTGAGCAGACGGAGTA
 Δ2 327 bp AAGACCCCGAGCCCCCGTGCCTGTGTCCCTGAGCAGACGGAGTA
 Δ3 531 bp AAGACCCCGAGCCCCCGTGCCTGTGTCCCTGAGCAGACGGAGTA
 Δ3* 489 bp AAGACCCCGAGCCCCCGTGCCTGTGTCCCTGAGCAGACGGAGTA
 Δ2,3 171 bp AAGACCCCGAGCCCCCGTGCCTGTGTCCCTGAGCAGACGGAGTA

PD1_gene TTTCTTAGCGGAATGGGCACCTCATCCCCGCCCGCAGGGGCTCAGCTGAGGGCCCTCGG

PD1_gene AGTGCCACGCCACTGAGGCCTGAGGATGGACACTGCTCTTGGCCCTCTGACCGGCTTCC

PD1_gene TTGGCCACCAGTGTCTGCAGACCCTCCACCATGAGCCCGGGTCAGCGCATTTCTCAGG

PD1_gene AGAAGCAGGCAGGGTGCAGGCCATTGCAGGCCGTCCAGGGGCTGAGCTGCCTGGGGCGA

PD1_gene CCGGGGCTCCAGCCTGCACCTGCACCAGGCACAGCCCCACCACAGGACTCATGTCTCAAT

PD1_gene GCCACAGTGAGCCAGGCAGCAGGTGTCACCGTCCCCTACAGGGAGGGCCAGATGCAGT

PD1_gene CACTGCTTACAGTCTGCCAGCACAGAGCTGCCTGCCTCAGCTCCCTGAATCTCTGCTG

PD1_gene CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCCTGCGGGCCGGGGCTGAAGGCGCCGTGGCCCTGCC

PD1_gene TGACGCCCCGGAGCCTCCTGCCTGAACCTGGGGGCTGGTTGGAGATGGCCTTGGAGCAGC

PD1_gene CAAGGTGCCCTTGGCAGTGGCATCCCGAAACGCCCTGGACGCAGGGCCCAAGACTGGGCA

PD1_gene CAGGAGTGGGAGGTACATGGGGCTGGGGACTCCCAGGAGTTATCTGCTCCCTGCAGGCC

PD1_gene TAGAGAAGTTTCAGGAAGGTGAGAAGAGCTCCTGGCTGTGGTGGGCAGGGCAGGAAACC

PD1_gene CCTCCACCTTTACACATGCCCAGGCAGCACCTCAGGCCCTTTGTGGGGCAGGGAAGCTGA

PD1_gene GGCAGTAAGCGGGCAGGCAGAGCTGGAGGCCCTTTCAGGCCAGCCAGCACTCTGGCCCTCC

PD1_gene TGCCGCCGATTTCCACCCAGCCCTCACACCACTCGGGAGAGGGACATCTACGGTCCC

PD1_gene AAGGTCAGGAGGGCAGGGCTGGGGTTGACTCAGGCCCTCCAGCTGTGGCCACCTGGGT

PD1_gene GTTGGGAGGGCAGAAGTGCAGGCACCTAGGGCCCCCATGTGCCACCCCTGGGAGCTCTC

PD1_gene CTTGGAACCCATTCTGAAATTATTTAAAGGGTTGGCCGGGCTCCCACCAGGGCCTGGG

PD1_gene TGGGAAGGTACAGGCCTCCCCCGGGGCTAGTACCCCCGCCGTGCCTATCCACTCCTC

PDI_gene **ACATCCACACACTGCACCCCACTCCTGGGGCAGGGCCACCAGCATCCAGGGCCAGCA**
 PDI_gene **GGCACCTGAGTGGCTGGGACAAGGGATCCCCCTCCCTGTGGTTCTATTATATTATAATT**
 PDI_gene **ATAATTAAATATGAGAGCATGCTAAGGA**

FIGURE S1. Alignment of the coding region of the *Homo sapiens* programmed cell death 1 (*PDCD1*) gene (accession number NC_000002.12:c241858908-241849881) with the different transcripts found in celiac patients. Primers used for RT-PCR amplification are also showed.

Full	687 bp	RPGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNHWYRMSPSNQTDKI	60
Full*	781 bp	RPGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNHWYRMSPSNQTDKI	60

Full	687 bp	AAFPEDRSQPGQDCRFVVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAI SLAPKAQIKESLR	120
Full*	781 bp	AAFPEDRSQPGQDCRFVVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAI SLAPKAQIKESLR	120

Full	687 bp	AELRVTERRAEVPTAHPSPSRPAGQFQTLVVG VVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRARGT	180
Full*	781 bp	AELRVTERRAEVPTAHPSPSRPAGQFQTLVVG VVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRARG-	179

Full	687 bp	IGARRTGQPLKEDPSAVPVFSDYGE LDFQWREKTPPEPPVPCVPEQTEX	229
Full*	781 bp	-----	

FIGURE S2. Alignment of translated sequence of the amplified region of 687 bp of the complete transcript of the *Homo sapiens* programmed cell death 1 (*PDCD1*) (accession number NM_005018) with the translated sequence of the Full 781* bp isoform found in celiacs. This isoform retain 95 bp of the intron 3. This 95 bp sequence provides a premature stop codon (TAA) that generates a truncated protein.

Full	687 bp	RPGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNHWYRMSPSNQTDKI	60
Full*	715 bp	RPGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNHWYRMSPSNQTDKI	60

Full	687 bp	AAFPEDRSQPGQDCRFVVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAI SLAPKAQIKESLR	120
Full*	715 bp	AAFPEDRSQPGQDCRFVVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAI SLAPKAQIKESLR	120

Full	687 bp	AELRVTERRAEVPTAHPSPSRPAGQFQTLVVG VVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRARGT	180
Full*	715 bp	AELRVTERRAEVPTAHPSPSRPAGQFQTLVVG VVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRARGT	180
***** * * * * *			
Full	687 bp	IGARRTGQPLKEDPSAVPVFSDYGE LDFQWREKTPPEPPVPCVPEQTEX	229
Full*	715 bp	HLLPGRTRDNRSQAHRPAPEGGPLSRACVLCGLWGAGFPVAREDPGAPRALCP	233
***** * * * * *			

FIGURE S3. Alignment of translated sequence of the amplified region of 687 bp of the complete transcript of the *Homo sapiens* programmed cell death 1 (*PDCD1*) (accession number NM_005018) with the translated sequence of the Full 715* bp isoform found in celiacs. This isoform retain 28 bp of the intron 2. As a consequence, there is a change in the reading frame that generates a totally different sequence of amino acids.

Fulll	687 bp	RPGWFLDSFDRFPWNPPTFSFALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNHWYRMSPSNQTDKL	60
Δ3*	489 bp	RPGWFL-----ALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNHWYRMSPSNQTDKL	46

Fulll	687 bp	AAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLFNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLR	120
Δ3*	489 bp	AAFPEDRSQPGQDCRFRVTQLFNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLR	106

Fulll	687 bp	AELRVTERRAEVPTAHSPSPRPAGQFQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRARAGT	180
Δ3*	489 bp	AELRV-----GT	114
		*****	**
Fulll	687 bp	IGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPPEPPVPCVPEQTEX	229
Δ3*	489-bp	IGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPPEPPVPCVPEQTE	163

FIGURE S4. Alignment of translated sequence of the amplified region of 687 bp of the complete transcript of the *Homo sapiens* programmed cell death 1 (*PDCD1*) (accession number NM_005018) with the translated sequence of the Δ3* isoform found in celiacs. This isoform does not show the first 42 bp of the exon 2. There is no change in the reading frame and therefore this transcript could generate a protein similar to Δ3 isoform but lacking of the first 14 amino acids formed by the exon 2.

Material suplementario – Artículo 3

PI3	CTAATAAGTGAGCCAGCACTTCTACTCTGTGAGAAAGTAGGAAAACCTCTGGGACAATCA	60
PI3-mRNA	-----	
PI3	GAGATGATGTGATGTAATGTCCATTAGTTCTTCTGTGAATAATCCTGAGGGAAAGCCCC	120
PI3-mRNA	-----	
PI3	CAGGTCCCTCCCAGAAATGGGGTGGATATTTCCAATACAGCTAAGGAATTATCCCTTGTA	180
PI3-mRNA	-----	
PI3	AATACCACAGACCCGCCCTGGAGCCAGGCCAAGCTGGACTGCATAAAGATTGGTATGGC	240
PI3-mRNA	-----	
PI3	CTTAGCTCTTAGCCAACACCTTCCTGACACCATGAGGGCCAGCAGCTTCTTGATCGTGG	300
PI3-mRNA	-----TTAGCCAACACCTTCCTGACACCATGAGGGCCAGCAGCTTCTTGATCGTGG	52

PI3	TGGTGTTCCTCATCGCTGGGACGCTGGTTCTAGAGGCAGCTGTCACGGGAGGTGAGTGAA	360
PI3-mRNA	TGGTGTTCCTCATCGCTGGGACGCTGGTTCTAGAGGCAGCTGTCACGGGAG-----	103

PI3	CAGGTGACCTGCTGGGCTGGGTTGGACTAAGGGGAGACCCCTCTGGGACACCCCTGGGCCAG	420
PI3-mRNA	-----	
PI3	GACAGGGAGCACTTCTGAAGCAGTAGGCAGCACTGGAGCCCAGATTCAGCTTTCTGTTC	480
PI3-mRNA	-----	
PI3	TTTGCCATCATATTCAGAAAAATAGGACTTTGGCTGGTGGACTCCACGTGCTTTCCACC	540
PI3-mRNA	-----	
PI3	TCAGTGACTGAGATATCAGGACTGTTTGTGGAAGTAATGTTGGTATGTGGCCTTGGCCTC	600
PI3-mRNA	-----	
PI3	AGATGTCAATACCTGTGCAGAATGTGCAATAAAATAATGAACTCCAGGATTTTAAACCTT	660
PI3-mRNA	-----	
PI3	GGGTGTGGACACAGTCCCCGTTTCTGCCCCATAAAAGCACTGGAGTAATCAGTACTC	720
PI3-mRNA	-----	
PI3	TAAAAGGAGGTTAAGAAACAACAAGCCTCAGGAATCATGTTGTTGAGGACCCCATTT	780
PI3-mRNA	-----	

```

PI3          TATAAGGAGGGAACCAAAAATGTAGAAATGAGTGAGCAATTGCCAAGGTAATCCAGAG 840
PI3-mRNA    -----

PI3          CCAGGATGGGGCTCAAGTCTCCTAGTATGTGGCTCAGGGTTCTTCTACTCCAATGCAC 900
PI3-mRNA    -----

PI3          TTCTAACAAATGACAATGTGTCTCTTCACTGCTGGGTGCACCCAGTCTGACCACTG 960
PI3-mRNA    -----

PI3          CTCTGAGAGACTTGGAGTGGAGGAAGGGGAAGAAACAAATACTCAAGGGAACTCTGGT 1020
PI3-mRNA    -----

PI3          CCAGTAGACCACCCCAAAAAGGAAGAGCCTTCCAAGAGTGTAGCTCCCAGAGGTGTACC 1080
PI3-mRNA    -----

PI3          TTCCCTACTCAGCCATGGTTTGAGGATGCTGCAGTAAGCAGTGGATGGACCCAGACCCA 1140
PI3-mRNA    -----

PI3          GAGGAAAGACATGGCAGCTGAAGCAGAGGCTTACTGGGTATAAATGTGGGCTCGTTTCTT 1200
PI3-mRNA    -----

PI3          CTTTTAACAGTTCTTGTAAAGGTCAAGACACTGTCAAAGGCCGTGTCCATTCAATGGA 1260
PI3-mRNA    -----TTCTGTAAAGGTCAAGACACTGTCAAAGGCCGTGTCCATTCAATGGA 153
                *****

PI3          CAAGATCCCGTTAAAGGACAAGTTTTCAGTTAAAGGTCAAGATAAAGTCAAAGCGCAAGAG 1320
PI3-mRNA    CAAGATCCCGTTAAAGGACAAGTTTTCAGTTAAAGGTCAAGATAAAGTCAAAGCGCAAGAG 213
                *****

PI3          CCAGTCAAAGGTCAGTCTCCACTAAGCCTGGCTCCTGCCCATTTATCTTGATCCGGTGC 1380
PI3-mRNA    CCAGTCAAAGGTCAGTCTCCACTAAGCCTGGCTCCTGCCCATTTATCTTGATCCGGTGC 273
                *****

PI3          GCCATGTTGAATCCCCCTAACCGCTGCTTGAAAGATACTGACTGCCCAGGAATCAAGAAG 1440
PI3-mRNA    GCCATGTTGAATCCCCCTAACCGCTGCTTGAAAGATACTGACTGCCCAGGAATCAAGAAG 333
                *****

PI3          TGCTGTGAAGGCTCTTGCGGGATGGCCTGTTTCGTTCCCCAGTGAAGTGAAGCACTAGCTG 1500
PI3-mRNA    TGCTGTGAAGGCTCTTGCGGGATGGCCTGTTTCGTTCCCCAGTGAAGTGAAGCACTAGCTG 379
                *****

PI3          GAGAACGAGGAGACCCTGAAGACACAAAAGAAGGCTGAGCGGTGGGGAAGCATCCCAGG 1560
PI3-mRNA    -----

PI3          TTGGTGGGAGGAGGTTGTGGGAGGTGACAGAAAGACTGGGAGACTGAGGGGTCTGAGAG 1620
PI3-mRNA    -----

PI3          GCTATAACCAGAGTGCCTAGAAGGATGATCTGTCTTCTCACTGCCTCTGAGTGCCTTGA 1680
PI3-mRNA    -----

PI3          TGTGCTGACTCTCACCTCTGATACTTCTCTTCCACAGAGGAGCCGGTCCCTGTGCTGCA 1740
PI3-mRNA    -----AGGGAGCCGGTCCCTGTGCTGCA 400
                *****

PI3          CCTGTGCCGTCCCAGAGTACAGGCCCATCTGGTCCTAAGTCCCTGTGCCCTTCCCC 1800
PI3-mRNA    CCTGTGCCGTCCCAGAGTACAGGCCCATCTGGTCCTAAGTCCCTGTGCCCTTCCCC 460
                *****

PI3          TTCCACACTGTCCATTCTTCTCCATTTCAGGATGCCACGGCTGGAGCTGCCTCTCTC 1860
PI3-mRNA    TTCCACACTGTCCATTCTTCTCCATTTCAGGATGCCACGGCTGGAGCTGCCTCTCTC 520
                *****

PI3          ATCCACTTTCCAATAAAGAGTTCCTTCTGCTCCACTTGTTCGTTTCTGTTTCTATGACTTCTG 1920
PI3-mRNA    ATCCACTTTCCAATAAAGAGTTCCTTCTGCTCCACTTGTTCGTTTCTGTTTCTATGACTTCTG 554
                *****

PI3          GGCTCCTGGATGCTTTGGGAAATGGATGTAGAATTGGGACTTCTTCTCCAGTGAAGA 1980
PI3-mRNA    -----AAA-----AAAA-----AAAA 565
                ***          * * *          * * *

PI3          GGGGAAACGGTCCCATGGTGAAGAGAGCAGGGCGGGGGAGGAAACAGGAGGCACATTG 2040
PI3-mRNA    AAAAAAA-----AAAAAA----- 579
                ***          *** * *

PI3          CTAGGGCTCATATTACAAATCCAATAATCAGCCCCAGTGTGCCAGTCTTTTCACCA 2100
PI3-mRNA    -----
    
```

PI3 GAAATGGAAATATGGAAATCTTGCCTTTGGCCAAGGACC 2140
PI3-mRNA -----

rs17333103
TGAATAACCTTCGGTGATTCTTTCTTCTTGGGTCTCACTGTATTTCAAACATGAAGAATTTTCATTGTAATGTACCTAATAAGT
GAGCCAGCACTTCTACTCTGTGAGAAAGTAGGAAACTCTTGGGACAATCAGAGATGATGTGATGTAATGTCCATTAGTTCTTCTGT
GAATAATCCTGAGGGAAAGCCCCAGGTCCCTCCCAGAAATGGGGTGGATATTTCCAATACAGCTAAGGAATATCCCTTGTAAATAC
CACAGACCCGCCCTGGAGCCAGGCCAAGCTGGACTGCATAAAGATTGGTATGGCCTTAGCTCTTAGCCAAACACCTTCTGACACCA
TGAGGGCCAGCAGCTTCTGGTGTCTCATCGCTGGGAYGCTGGTTCTAGAGGCAGCTGTCACGGGAGGTGAGTGAACAGGTGACCTG
CTGGGCTGGGTTGGACTAAGGGGAGACCCCTCTGGGACACCTGGGCCAGGACAGGGAGCACTTCTGAAGCAGTAGGCAGCACTGGAGC
CCAGATTTTCCAGTTTCTGTCTTTGCCATCATATTCAGAAAAAATAGGACTTTGGCTGGTGGACTCCAGTCTTTCCACCTCAGTGA
CTGAGATATCAGGACTGTTTGTGGAAGTAATGTTGGTATGTGGCCTTGGCCTCAGATGTCAATACCTGTGCAGAATGTGCAATAAAAT
AATGAACCTCAGGATTTTAAACCTTGGGTGTGGACACAGTCCCCCGTTTCTGCCCCATAAAAGCACTGGAGTAATCAGTACTCTA

>rs41282752
GACTTGCTGAATAACCTTCGGTGATTCTTTCTTCTTGGGTCTCACTGTATTTCAAACATGAAGAATTTTCATTGTAATGTACCT
AATAAGTGAGCCAGCACTTCTACTCTGTGAGAAAGTAGGAAACTCTTGGGACAATCAGAGATGATGTGATGTAATGTCCATTAGTTCT
TTCCTGTGAATAATCCTGAGGGAAAGCCCCAGGTCCCTCCCAGAAATGGGGTGGATATTTCCAATACAGCTAAGGAATATCCCTTGT
TAAATACCACAGACCCGCCCTGGAGCCAGGCCAAGCTGGACTGCATAAAGATTGGTATGGCCTTAGCTCTTAGCCAAACACCTTCTT
GACACCATGAGGGCCAGCAGCTTCTTGATCGTGGTGGTGTTCCTCATCCTGGGACGCTGGTTCTAGAGGCAGCTGTACGGGAGGTG
AGTGAACAGGTGACCTGCTGGGCTGGGTTGGACTAAGGGGAGACCCCTCTGGGACACCTGGGCCAGGACAGGGAGCACTTCTGAAGCA
GTAGGCAGCACTGGAGCCCAGATTTCCAGCTTCTGTCTTTGCCATCATATTCAGAAAAAATAGGACTTTGGCTGGTGGACTCCACGT
GCTTTCCACCTCAGTACTGAGATATCAGGACTGTTTGTGGAAGTAATGTTGGTATGTGGCCTTGGCCTCAGATGTCAATACCTGTGC
AGAAATGTGCAATAAAATAATGAACCTCAGGATTTTAAACCTTGGGTGTGGACACAGTCCCCCGTTTCTGCCCCATAAAAGCACTGG
AGTAATCAG

>rs2664581
CTGCTGGGTGTACCCAGTCTGACCAGTCTCCTGAGAGACTTGGAGTGGAGGAAGGGGGAAGAAACAAATACTCAAGGGAACCTG
GTCCTGTAGACCACCCCAAAAAGGAGAGCCTTCCAAGAGTGTAGCTCCCAGAGGTGTACCTTCCCTACTCAGGCCATGGTTTGGAG
ATGCTGCAGTAAGCAGTGGATGGACCCAGACCCAGAGGAAAGACATGGCAGCTGAAGCAGAGGCTTACTGGGTATAAATGTGGGCTCG
TTTCTTCTTTTAAACAGTCTCCTGTTAAAGGTCAAGACMCTGTCAAAGGCCGTGTTCCATTCAATGGACAAGATCCCGTTAAAGGACAAG
TTTTAGTTAAAGGTCAAGATAAAGTCAAAGCGCAAGAGCCAGTCAAAGGTCCAGTCTCCACTAAGCCTGGCTCCTGCCCCATTATCTT
GATCCGGTGCACATGTTGAATCCCCCTAACCGCTGCTTGAAGATACTGACTGCCAGGAATCAAGAAGTGTGTGAAGGCTCTTGC
GGGATGGCCTGTTTCGTTCCCCAGTGGAGTGGACTAGCTGGAGAACGAGGAGACCCCTGAAGACACAAAAG

PI3-119-F CCCAGGTCCCTCCCAGAA
PI3-969-R CCTTCTCCTCACTCCAAGTCT

PI3 -----CTAATAAGTGAGCCAGCACTTCTACTCTGTGAGA 34
PI3 AAGTAGGAAAACCTTGGGACAATCAGAGATGATGTGATGTAATGTCCATTAGTTCTTCC 94

PI3-F 5' CCCAGGTCCCTCCCAGAA

PI3 TGTGAATAATCCTGAGGGAAAGCCCCAGGTCCCTCCCAGAAATGGGGTGGATATTTCCCA 154

PI3 ATACAGCTAAGGAATTATCCCTTGTAAATACCACAGACCCGCCCTGGAGCCAGGCCAAG 214
PI3 CTGGACTGCATAAAGATTGGTATGGCCTTAGCTCTTAGCCAAACACCTTCTGACACCAT 274

(BtsCI) GGATGNN^

rs17333103 GAGGGCCAGCAGCTTCTTGATCGTGGTGGTGTTCCTCATCGCTGGGAYGCTGGTTCTAGA 403

PI3 GAGGGCCAGCAGCTTCTTGATCGTGGTGGTGTTCCTCATCGCTGGGAYGCTGGTTCTAGA 334

rs41282752 GAGGGCCAGCAGCTTCTTGATCGTGGTGGTGTTCCTCATCCTGGGACGCTGGTTCTAGA 420

(BsrI) ACTGNN^

PI3 GGCAGCTGTACGGGAGGTGAGTGAACAGGTGACCTGCTGGGCTGGGTTGGACTAAGGGG 394

PI3 AGACCTCTGGGACACCTTGGGCCAGGACAGGGAGCACTTCTGAAGCAGTAGGCAGCACT 454

PI3 GGAGCCAGATTTCCAGCTTCTGTCTTTGCCATCATATTCAGAAAAAATAGGACTTTGG 514

PI3 CTGGTGGACTCCAGTGTCTTCCACCTCAGTACTGAGATATCAGGACTGTTTGTGGAAG 574 EXÓN 1

PI3 TAATGTTGGTATGTGGCCTTGGCCTCAGATGTCAATACCTGTGCAGAATGTGCAATAAAA 634

PI3 TAATGAACCTCAGGATTTTAAACCTTGGGTGTGGACACAGTCCCCCGTTTCTGCCCCA 694

PI3 TAAAGCACTGGAGTAATCAGTACTCTAAAAGGAGGTTAAGAAACAACAAGCCTTCAGGA 754

PI3 ATCATGTTGTTTGGAGACCCCATTTTATAAGGAGGGAACCAAAAATGTAGAAATGAGTG 814

PI3 AGCAATTGCCAAGGTAATTTCCAGAGCCAGGATGGGGCTCAAGTCTCCCTAGTATGTGGCT 874

PI3 CAGGGTCTTCTTCTACTCCAATGCAC

PI3 TTCTTAACAAATGACAATGTGCTCTTCACTGCTGGGTGTACCCAGTCTGACCACTG 960

TCTGAACCTCACCACCTTCC- 5' PI3-R

PI3 CTCTGAGAGACTTGGAGTGGAGGAAGGGGGAAGAAACAAATACTCAAGGAACTCTGGT 1020

PI3 CCAGTAGACCACCCCAAAAAGGAGAGCCTTCCAAGAGTGTAGCTCCCAGAGGTGTACC 1080

PI3 TTCCCTACTCAGGCCATGGTTTGAAGGATGCTGACAGTAAGCAGTGGATGGACCCAGACCCA 1140

PI3 GAGGAAAGACATGGCAGCTGAAGCAGAGCCTTACTGGGTATAAATGTGGGCTCGTTTCTT 1200

PI3-1080-F CTTCCCTACTCAGGCCATGG
PI3-1523-R CGCTCAGCCTTCTTTTGTGT

PI3 CTTGGTGGACTCCACGTGCTTTCCACCTCAGTGACTGAGATATCAGGACTGTTTGTGGGAA 574
PI3 TAATGTTGGTATGTGGCCTTGGCCTCAGATGTCAATACCTGTGCAGAATGTGCAATAAAA 634
PI3 TAATGAACFCCAGGATTTTAAACCTTGGGTGTGGACACAGTCCCCCGTTTCTCTGCCCCA 694
PI3 TAAAAGCACTGGAGTAATCAGTACTCTAAAAGGAGGTTAAGAAACAACAAGCCTTCAGGA 754
PI3 ATCATGTTGTTTGGAGACCCCATTTTATAAGGAGGGAACCAAAAATGTAGAAATGAGTG 814
PI3 AGCAATTGCAAGGTAATTCACAGGCCAGGATGGGCTCAAGTCTCCTAGTATGTGGCT 874
PI3 CAGGGTTCCTTCTACTCCAATGCAC
PI3 TTCCTAACAAATGACAATGTGTCTCTTCACTGCTGGGTGTCAACCCAGTCTGACCACTG 960
PI3 CTCCTGAGAGACTTGGAGTGGAGGAAGGGGGAAGAAACAATACTCAAGGAACTCTGGT 1020
PI3 CCAGTAGACCACCCCAAAAAGGAAGAGCCTTCCAAGAGTGTAGCTCCAGAGGTGTACC 1080
PI3-1080-F 5' - C
TTCCCTACTCAGGCCATGG
PI3 TTCCCTACTCAGGCCATGGTTTGAAGGATGCTGAGTAAAGCAGTGGATGGACCCAGACCCA 1140
PI3 GAGGAAAGACATGGCAGCTGAAGCAGAGGCTTACTGGGTATAAATGTGGGCTCGTTTCTT 1200
(HpyCH4III) ACNGT ACNGT
rs2664581 CTTTTAACAGTTCCTGTTAAAGGTCAAGACMCTGTCAAAGGCCGTGTTCCATTCAATGGA 330
PI3 CTTTTAACAGTTCCTGTTAAAGGTCAAGACACTGTCAAAGGCCGTGTTCCATTCAATGGA 1260

PI3 CAAGATCCCGTTAAAGGACAAGTTTTCAGTTAAAGGTCAAGATAAAGTCAAAGCGCAAGAG 1320
PI3 CCAGTCAAAGTCCAGTCTCCACTAAGCCTGGCTCCTGCCCATTTATCTTGATCCGGTGC 1380 EXON 2
PI3 GCCATGTTGAATCCCCTAACCCTGCTTGAAGATACTGACTGCCAGGAATCAAGAAG 1440
PI3 TGCTGTGAAGGCTCTTGGGGATGGCCTGTTTCGTTCCCAAGTGGAGTGGAGCACTAGCTG 1500
TGTGTTTCTTCCGACTCGC - 5' PI3-1523-R
PI3 GAGAACGAGGAGACCCCTGAAGACAAAAGAGGCTGAGCGTGGGGAAGCATCCCAGG 1560
PI3 TTGGTGGGAGGAGGTTGTGGGAGGTGACAGAAAGACTGGGAGACTGAGGGGTCTGAGAG 1620
PI3 GCTATAACCAGAGTGCCCTAGAAGGATGATCTGTCTTCCCTCACTGCCTCTGAGTGCCTTGA 1680
PI3 TGTGCTGACTCTCACCTCTGATACTCTTCTTCCACAGAGGGAGCCGGTCTTGCTGCA 1740
PI3 CCTGTGCCGTCCCAGAGTACAGGCCCATCTGGTCCCTAAGTCCCTGCTGCCCTTCCCC 1800 EXON 3
PI3 TTCCACACTGTCCATTCTTCTCCATTCAAGATGCCACGGCTGGAGCTGCCTCTCTC 1860
PI3 ATCCACTTCCAATAAAGAGTTCCTTCTGCTCCACTGTTTCTGGTTCCTATGACTTCTG 1920

rs17333103 (BtsCI) GGATGNN^ POSITION 320
rs41282752 (BsrI) ACTGGN^ POSITION 325
rs2664581 (HpyCH4III) ACNGT POSITION 1233

320 * (BsrI) ACTG_GN^
325 * (BtsCI) GGATG_NN^
1233 (HpyCH4III) AC_N^GT

FIGURE S1. Alignment of primers to the coding region of the gene de Homo sapiens peptidase inhibitor 3, skin-derived (PI3) (NM_002638.3) and the restriction sites that the enzymes recognise within the gene.

PI3-119-F CCCAGGTCCCTCCCAGAA
PI3-969-R CTTCTCTCCACTCCAAGTCT

rs17333103 (BtsCI) GGATGNN^ POSITION 390

>PI3
CCCAGGTCCCTCCCAGAAATGGGGTGGATATTTCCCAATACAGCTAAGGAATTATCCCTTGTAATACCACAGACCCGCCCTGGAGCCAGGCCAAGC
TGGACTGCATAAAGATTGGTATGGCCTTAGCTCTTAGCCAAACACTTCTGACACCATGAGGGCCAGCAGCTTCTTGATCGTGGTGGTTCCTCA

TCRctggaYgCTGGTTCTAGAGGCAGCTGTACGGGAGGTGAGTGACAGGTGACCTGCTGGGCTGGGTTGGACTAAGGGGAGACCCTCTGGGAC
 ACCCTGGGCCAGGACAGGAGCACTTCTGAAGCAGTAGGCAGCACTGGAGCCAGATTTTCAGCTTCTGTTCTTTGCCATCATATTCAGAAAAATA
 GGACTTTGGCTGGTGGACTCCACGTGCTTCCACCTCAGTGACTGAGATATCAGGACTGTTTGTGGAAGTAATGTTGGTATGTGGCTTGGCCTCAG
 ATGTCAATACCTGTGCAATGTGAATAAATAAATGAACCTCCAGGATTTTAAACCTTGGGTGTGGACACAGTCCCCGTTTCTCTGCCCATAAAA
 GCACTGGAGTAATCAGTACTCTAAAAGGAGGTTAAGAAACAACAAGCCTTCAGGAATCATGTTGTTTGGAGACCCCATTTTATAAGGAGGGAACCA
 AAAATGTAGAAATGAGTGAGCAATTGCCAAGTAATCCCAGAGCCAGGATGG

GCTCAAGTCTCTAGTATGTGGCTCAGGGTCTTTCTACTCCAATGCACCTTCTTAACAAATGACAATGTGTCTCTTACTGCTGGGTGTCACCCC
 AGTCTGACCACTGCTCCTGAGAGACTTGGAGTGGAGGAAG

870 bp 732 (206 – 526), 138

rs41282752 (BsrI) ACTGGN^ POSITION 383

>PI3
CCCAGGTCCTCCAGAATGGGGTGGATATTTCCCAATACAGCTAAGGAATTATCCCTTGTAATACCACAGACCCGCCCTGGAGCCAGGCCAAGC
 TGGACTGCATAAAGATTGGTATGGCCTTAGCTCTTAGCCAAACACCTTCTGACACCATGAGGGCCAGCAGCTTCTGATCGTGGTGGTTCCTCA
 TCRctggaYgCTGGTTCTAGAGGCAGCTGTACGGGAGGTGAGTGACAGGTGACCTGCTGGGCTGGGTTGGACTAAGGGGAGACCCTCTGGGAC
 ACCCTGGGCCAGGACAGGAGCACTTCTGAAGCAGTAGGCAGCACTGGA

GCCAGATTTACAGTCTTCTGTTCTTTCACATCATATTCAGAAAAATAGGACTTTGGCTGGTGGACTCCACGTGCTTTCCACCTCAGTGACTGAGAT
 ATCAGGACTGTTTGTGGAAGTAATGTTGGTATGTGGCCTTGGCCTCAGATGTCAATACCTGTGCAATGTTGCAATAAATAAATGAACCTCCAGGAT
 TTAACCTTGGGTGTGGACACAGTCCCCGTTTCTCTGCCCATAAAAGCACTGGA

GTAATCAGTACTCTAAAAGGAGGTTAAGAAACAACAAGCCTTCCAGGAATCATGTTGTTTGGAGACCCCATTTTATAAGGAGGGAACAAAAATGTA
 GAAATGAGTGAGCAATTGCCAAGTAATCCCAGAGCCAGGATGGGCTCAAGTCTCCTAGTATGTGGCTCAGGGTCTTTCTACTCCAATGCACT
 TCTTAACAAATGACAATGTGTCTCTTACTGCTGGGTGTCACCCAGTCTGACCACTGCTCTGAGAGACTTGGAGTGGAGGAAG

870 bp 339 (202 – 137), 250, 281

PI3-1080-F CTTCCCTACTCAGGCCATGG
 PI3-1523-R CGCTCAGCCTTCTTTGTGT

rs2664581 (HpyCH4III) ACNGT POSITION 1231

CTTCCCTACTCAGGCCATGGTTTGAGGATGCTGCAGTAAGCAGTGGATGGACCCAGACCCAGAGGAAAGACATGGCAGTGAAGCAGAGGCTTACTG
 GGTATAAATGTGGGCTCGTTTCTTTTAAACAGTTCCTGTTAAAGGTCAAGACMctGTCAAAGGCCGTGTTCCATTCAATGGACAAGATCCCGTT
 AAAGGACAAGTTTCAAGTTAAAGGTCAAGATAAAGTCAAAGCGCAAGAGCCAGTCAAAGTCCAGTCTCCACTAAGCCTGGCTCCTGCCCATTTATCT
 TGATCCGGTGCAGCATGTTGAATCCCCCTAACCGTCTTGAAGATACTGACTGCCAGGAATCAAGAAGTGTGTAAGGCTCTTGCAGGATGGCGGATGG
 CTGTTTCGTTCCCAAGTGAAGTGAGCACTAGCTGGAGAACGAGGAGACCCCTGAAGACACAAAAGAAGGCTGAGCC

463 bp 130, 333 (24 – 309)

FIGURE S2. Location of the different SNPs along with the restriction enzyme cutting targets within the fragments amplified by the primers.