

# Enfermedad celíaca. Nuevas perspectivas terapéuticas basadas en un mejor conocimiento de su patogenia molecular

Fernando G Chirido,<sup>1</sup> José A Garrote,<sup>2,3</sup> Eduardo Arranz<sup>3</sup>

*Acta Gastroenterol Latinoam 2005;35:183-189*

## Resumen

La enfermedad celíaca (EC) es una patología gastrointestinal crónica de tipo autoinmune desencadenada por un antígeno exógeno conocido (el gluten). Está fuertemente asociada al sistema HLA, aunque otros factores genéticos, ambientales e inmunológicos, aún no completamente identificados, determinarían el momento y forma de presentación. La respuesta inmune en la mucosa intestinal frente a ciertos péptidos derivados de gliadinas es caracterizada por una fuerte respuesta de tipo TH1 (con predominio de IFN $\gamma$  secretado por linfocitos T específicos), la que es probablemente precedida por una respuesta inmune innata, mediada fundamentalmente por IL-15. La dieta estricta libre de gluten es la forma más eficaz de revertir las alteraciones de la mucosa intestinal y la sintomatología. Sin embargo, las transgresiones y el bajo cumplimiento de la dieta han conducido a formular nuevas estrategias terapéuticas que se discuten en esta revisión.

## Summary

**Celiac disease. New therapeutic alternatives based on a better knowledge of molecular pathogenesis**

Celiac disease is a chronic autoimmune-like gastroin-

testinal disorder triggered by a known exogenous antigen (gluten). The disease is strongly linked to the HLA system, though other genetic, environmental and immunologic factors, may determine the type and timing of presentation. The immune response within the intestinal mucosa is characterized by a well defined TH1 response, where IFN $\gamma$  secreted by specific T cells is the predominant cytokine, as well as an innate immune response to certain gluten-derived peptides, mediated by IL-15. The strict gluten-exclusion diet is the best way of reversing both the symptoms and the histological changes in the intestinal mucosa. However, the frequency of transgressions and a low dietary compliance had led to the description of new therapeutic alternatives discussed in this review.

**Index (palabras claves):** Enfermedad celíaca, patogenia, terapia, inmunomodulación.

## Lista de abreviaturas.

HLA: antígenos leucocitarios humanos

IFN $\gamma$ : interferón gamma

TH1: T helper 1

IL-15: interleuquina 15

TG2: transglutaminasa 2

IEL: linfocitos intraepiteliales

## Bases inmunológicas de la patología

La enfermedad celíaca (EC) es el resultado de la interacción entre factores genéticos y ambientales, expresándose en individuos genéticamente susceptibles mediante una respuesta inmune inadecuada frente a péptidos derivados de prolaminas de trigo, cebada, centeno y, probablemente, también de avena. Es conocido que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de lámina propia de la mucosa intestinal constituyen un elemento central de la inmunopatogenia, ya que reconocen péptidos de gliadinas modificados por la enzima transglutaminasa 2 (TG2), en el contexto de

<sup>1</sup> Cátedra de Inmunología. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. La Plata. Argentina. e-mail: fchirido@biol.unlp.edu.ar

<sup>2</sup> Unidad de Investigación, Hospital Clínico Universitario de Valladolid, España

<sup>3</sup> Áreas de Pediatría e Inmunología, e Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM) Universidad de Valladolid, España. earranz@med.uva.es

**Correspondencia:** Eduardo Arranz  
Facultad de Medicina. Avenida Ramón y Cajal 7  
47005-Valladolid, España  
Teléfono +34 983 423189 / 86 - FAX: +34 983 183812  
E-mail: earranz@med.uva.es

moléculas HLA-DQ2/DQ8, y liberan citoquinas y otros mediadores de inflamación que, en conjunto, determinan los cambios histológicos característicos.<sup>1-4</sup> Tradicionalmente se ha considerado la EC como el resultado de una respuesta inmune adaptativa alterada frente a péptidos tóxicos, como los de la región 56-88 de las  $\alpha$ -gliadinas;<sup>5-7</sup> sin embargo, la inmunidad innata parece jugar un rol crítico en el desencadenamiento de las señales inflamatorias iniciales.<sup>8,9</sup> Por lo tanto, el gluten podría activar dos tipos de respuesta inmune que se desarrollarían de forma consecutiva o en paralelo.

La EC tiene una base genética conocida y presenta una de las asociaciones más fuertes con genes situados en la región del HLA de clase II, los que podrían contribuir al 40% de la predisposición genética.<sup>10</sup> Más del 95% de los pacientes con EC presentan los alelos de riesgo DQB1\*02 y DQA1\*0501 o DQB1\*0302 y DQA1\*03,<sup>1,11</sup> y los casos DQ2/DQ8 negativo, suelen tener al menos uno de los alelos de riesgo por separado (DQA1\*0501 ó DQB1\*02), siendo muy raros los casos en los que ambos están ausentes.<sup>12</sup> Sin embargo, la concordancia de EC en gemelos monocigotos es del 75% y sólo un 1-2% de los individuos portadores de HLA-DQ2/DQ8 desarrollan la enfermedad, lo que sugiere que otros factores serían responsables de la activación (o cronificación) de la respuesta inmune local frente a las prolaminas tóxicas en individuos genéticamente predisuestos. Se han descrito varias zonas “calientes” en el genoma<sup>13</sup> y algunos genes candidatos fuera del HLA, pero sin llegar a ningún resultado concluyente. Se postula que diferentes combinaciones de las variantes de genes implicadas en la respuesta inmune podrían determinar el curso y/o la expresión de la EC en cada paciente.<sup>3,10</sup>

La falta de un modelo animal que reproduzca la enfermedad dificulta obtener información del sistema biológico completo. Es así, que los ensayos *ex vivo* donde se cultivan piezas de biopsias con diferentes fragmentos de prolaminas, si bien difíciles de realizar por cuestiones éticas y experimentales, han aportado información sumamente valiosa en las últimas dos décadas. En este sentido, la observación de las alteraciones histológicas, así como los marcadores de activación de células T, en cortes de biopsias incubadas con diferentes fracciones, permitió la identificación de los fragmentos tóxicos (por ejemplo péptidos derivados de la digestión de gliadinas por tripsina y pepsina).<sup>14-16</sup>

Mediante ensayos *in vitro* empleando líneas T es-

tablecidas de la mucosa intestinal de pacientes celíacos, se obtuvo un conocimiento más preciso de las secuencias inductoras de estimulación T y potencialmente tóxicas,<sup>17-19</sup> siendo una de las más estudiadas el péptido 33-mer (56-88) de las  $\alpha$ -gliadinas.<sup>7</sup> Si bien la mayoría de los estudios se basan en el análisis de fragmentos derivados de gliadinas, también se encuentran secuencias tóxicas en gluteninas.<sup>20</sup> Además, Vader y col<sup>21</sup> mostraron que se puede observar una reactividad similar al comparar los índices de estimulación de diferentes líneas T frente a péptidos de gliadinas, hordeínas (cebada) y secalinas (centeno). El análisis de secuencia de los fragmentos empleados mostró que comparten cierto grado de homología.

La observación de que los péptidos de gliadinas deamidados por TG2 presentaban mayor capacidad de unión a HLA-DQ2 y mayor estimulación de las líneas T, introdujo un cambio sustancial en la interpretación del rol de la TG2 en la patología.<sup>22,23</sup> La deamidación de glutaminas por TG2 no es al azar, ya que estudiando substratos naturales o péptidos de síntesis, se establecieron ciertos requisitos de secuencia para la deamidación selectiva.<sup>24</sup> Por otro lado, los estudios de unión de péptidos a la molécula HLA-DQ2<sup>25,26</sup> y a DQ8,<sup>23</sup> permitieron establecer las restricciones de anclaje y definir las secuencias de gliadinas que tienen mayor afinidad de unión. Considerando en conjunto las restricciones de secuencia para la deamidación selectiva y las restricciones de anclaje de las moléculas HLA-DQ2/DQ8, fue posible proponer algoritmos que predicen, en forma teórica, las secuencias potencialmente tóxicas.<sup>21</sup>

La estimulación *in vitro* de biopsias de intestino delgado de pacientes celíacos con fragmentos de gliadinas obtenidos por digestión enzimática o con péptidos sintéticos, induce una respuesta de tipo TH1, en la que predomina el IFN $\gamma$ , cuyos niveles se normalizan en la fase de remisión.<sup>2,27-29</sup> Dado que el IFN $\gamma$  se produce en ausencia de IL-12, su síntesis dependería de otros factores, como IFN $\alpha$ ,<sup>30</sup> y de otras citoquinas de la familia del receptor IL-2R (clase I),<sup>31</sup> como IL-18, IL-7 e IL-15.<sup>32,33</sup>

La IL-10 tiene un importante rol regulador de la respuesta en la mucosa y, en particular, se ha sugerido que podría inhibir las respuestas TH1 frente al gluten.<sup>34</sup> La mucosa intestinal produce IL-10, cuyo origen puede estar en los linfocitos T de la lámina propia<sup>35</sup> o en los linfocitos intraepiteliales (LIEs),<sup>29</sup> aunque hay estudios en los que no se ha detectado expresión RNAm de IL-10 en el intestino de pa-

cientes con EC.<sup>27</sup> Otro factor regulador de interés es el TGF $\beta$ , cuya expresión está disminuida en la EC, comparado con el intestino sano.<sup>36</sup> Un rol importante lo tendrían las células dendríticas de la lámina propia ya que participan en la modulación de la respuesta y en la diferenciación de las células T reguladoras.<sup>37</sup>

En resumen, la activación de linfocitos T reactivos al gluten, en el intestino delgado de pacientes celíacos, pone en marcha una respuesta inflamatoria dominada por citoquinas de perfil TH1, en el que predomina el IFN $\gamma$ , y otras citoquinas proinflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-15 e IL-18), con un descenso proporcional de la expresión de citoquinas inmunoreguladoras (IL-10 y TGF $\beta$ ), (Arranz E, observación no publicada). Este desequilibrio, además de incrementar el número de células del sistema inmune en la mucosa intestinal y el grado de activación, regula la actividad de los factores de crecimiento epitelial y de las metaloproteinasas. Estas últimas están encargadas de mantener y renovar la estructura de la mucosa, y en situaciones de inflamación, provocan la lesión intestinal que conduce al síndrome de malabsorción.<sup>38,39</sup>

## El tratamiento

En la actualidad, el único tratamiento efectivo para la EC es la exclusión total del gluten de la dieta. El cumplimiento estricto de la dieta conduce, en la mayoría de los casos, a una rápida y completa recuperación de la histología normal de la mucosa intestinal, remisión de los síntomas y negativización de los marcadores serológicos en pocos meses. El control del seguimiento de la dieta se realiza comúnmente mediante la determinación de anticuerpos anti-gliadinas en sangre periférica, ya que constituyen un buen indicador de las transgresiones.<sup>40</sup>

El cumplimiento de la dieta es muchas veces no satisfactorio debido a la ingesta inadvertida de gluten por falta de información precisa de los pacientes sobre los productos aptos y errores en la identificación de los productos comerciales. Sin embargo, el mayor problema lo constituyen las transgresiones voluntarias, principalmente debido al desconocimiento de los pacientes sobre sus consecuencias, a un espectro limitado de productos libres de gluten apetecibles que hacen poco atractiva la dieta a largo plazo y al costo elevado de los productos. También se ha observado que el cumplimiento es más bajo en los pacientes adultos con escasa o nula sintomatología al momento de su diagnóstico, o en aquellos que

han sido diagnosticados mediante un protocolo de *screening*.<sup>41,42</sup>

La evaluación de parámetros de calidad de vida (aquellos que consideran no sólo la condición física o clínica de los pacientes, sino también la situación anímica y cómo el paciente interpreta su condición), muestra claramente que muchos pacientes encuentran difícil sobrellevar la dieta libre de gluten en forma estricta. Por esta razón, se ha propuesto que la ingesta de bajas cantidades de gluten, en ciertas ocasiones como viajes o eventos sociales, o el empleo de terapias complementarias a la dieta, podría mejorar la calidad de vida de los pacientes.<sup>43</sup>

## Nuevas estrategias terapéuticas

Las estrategias planteadas consideran, por un lado, la manipulación del agente desencadenante mediante el empleo de variantes de trigo deprivadas o reducidas en péptidos tóxicos, o bien induciendo la proteólisis enzimática de los fragmentos tóxicos. Por otro lado, es necesario identificar posibles blancos terapéuticos que permitan el desarrollo de protocolos de inmunomodulación local y específica en la mucosa intestinal frente al gluten, inhibiendo la activación de linfocitos T reactivos al gluten o bloqueando los mediadores de la cascada inflamatoria. El nuevo agente terapéutico debe inducir una buena tolerancia local (y sistémica), no presentar antigenicidad ni efectos secundarios indeseados y permitir la administración dirigida o localización específica en el intestino.<sup>42</sup>

### I.- Modificación del agente desencadenante

**Ia. Modificación de las proteínas vegetales.** El trigo es el cereal más frecuentemente empleado en alimentación humana dada su propiedad única de formar una masa viscoelástica que atrapa gas. A pesar del intenso estudio bioquímico, la complejidad de las prolaminas hace muy difícil establecer inequívocamente las gliadinas y gluteninas responsables de dichas propiedades fisicoquímicas. El objetivo de obtener un trigo deprivado de subunidades tóxicas (tanto para la respuesta innata como para la adaptativa) es inviabilizable al considerar el trabajo de biología molecular y la genética vegetal, y además, conduciría, muy probablemente, a un cereal modificado incapaz de formar masa. En cambio, la propuesta de seleccionar variedades de trigo con menor contenido de ciertas prolaminas tóxicas parece de mayor factibilidad. Más recientemente se ha propuesto el

empleo de otros vegetales (por ejemplo, maíz) sobre los cuales se podría introducir un conjunto de genes codificantes de gliadinas y gluteninas reconocidas por su capacidad de formar masa pero que no incluyan péptidos tóxicos en sus secuencias.

**Ib. Detoxificación de péptidos de gluten.** El hallazgo de una enzima bacteriana (prolil-endopeptidasa, PEP) capaz de digerir fragmentos peptídicos ricos en prolina, despertó interés por su utilización para degradar péptidos de gliadinas tóxicos.<sup>44,18</sup> Se ha confirmado la acción proteolítica de la PEP en cultivo, ya que al incubarla con péptidos tóxicos se observó una reducción de la estimulación de líneas celulares T de pacientes con EC.<sup>45</sup> Aunque los estudios moleculares están avanzados, se encuentran varias cuestiones aún por resolver antes que su administración oral se establezca como una terapia útil. La actividad enzimática no es elevada y se desconoce la dosis que sería necesaria para tener una efectiva proteólisis del gluten ingerido antes que los fragmentos tóxicos interaccionen con la mucosa intestinal.

## II. Modificación de la actividad de los linfocitos T

**Ia. Inhibición de la actividad enzimática de la TG2.** Como se mencionó, TG2 tiene un papel central en la generación de epitopes T mediante la deamidación selectiva de residuos de glutamina.<sup>46</sup> El bloqueo de la actividad de la TG2 reduciría la formación de péptidos con mayor actividad estimuladora de linfocitos T. Para tal fin, se encuentran en desarrollo compuestos que específicamente bloquean el sitio activo de TG2. Entre los inconvenientes de esta estrategia se encuentran los posibles efectos secundarios debidos a la inhibición de TG2 en otros sitios fuera del intestino delgado. Además, se han descrito otros péptidos tóxicos que no requieren deamidación y que podrían ser suficientes para mantener o iniciar el fenómeno inflamatorio.<sup>24</sup>

**Iib. Estimulación inadecuada de los linfocitos T.** Se puede lograr el bloqueo de la unión de péptidos tóxicos a la molécula HLA-DQ2 mediante la competición con péptidos análogos (sintéticos) no estimuladores de linfocitos T. La interacción con los péptidos análogos lleva a la inactivación funcional de los linfocitos T reactivos (anergia). La estrategia ha sido utilizada en otras enfermedades asociadas al sistema HLA.<sup>47</sup>

Otra vía es la utilización de complejos solubles formados por moléculas HLA-DQ2/ péptido de gliadinas.<sup>48</sup> Estos complejos pueden inducir la

muerte celular (apoptosis) de los linfocitos T específicos, aunque, al presente es dudoso que pueda resolverse el inconveniente que crea la gran heterogeneidad de péptidos tóxicos, y el hecho que las moléculas HLA son sintetizadas continuamente por células presentadoras de antígeno, es decir que siempre existiría presentación antigénica funcional.<sup>3</sup>

**Iic. Inhibición de la migración de los linfocitos T.** El empleo de antagonistas de las integrinas que median la migración de linfocitos T a la mucosa intestinal (integrina  $\alpha_4$ ) y en particular  $\alpha_4\beta_7$ , se ha propuesto para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal. De esta manera, se evitaría la llegada de células T activadas y efectoras de citotoxicidad a la capa epitelial.<sup>43</sup>

## III. Inmunomodulación

**IIIa.- Expansión de los linfocitos T reguladores.** Se sabe que es posible modificar los mecanismos efectores en el caso de la mucosa celíaca diferenciados hacia TH1, mediante el balance local de citoquinas, en particular mediante la inducción de IL-10. Utilizando piezas de biopsia de intestino de pacientes celíacos incubadas con IL-10 recombinante humana, Salvati y col,<sup>34</sup> observaron una disminución de la activación de células T específicas de gliadinas. Esto puede deberse a una menor capacidad estimuladora de las células dendríticas (ya que, entre otros factores, existe disminución de la expresión de CD80), disminución de los niveles de IFN $\gamma$  e IL-2 y migración reducida de linfocitos T al compartimiento intraepitelial. Un hallazgo importante como base de posible uso terapéutico es la observación de linfocitos T aislados de la mucosa intestinal celíaca, cultivados en presencia de IL-10 y péptidos de gliadinas tóxicos, que se diferencian *in vitro* a linfocitos T reguladores del tipo TH3 o Tr1 (secretores de TGF $\beta$  o IL-10, respectivamente), o se establece un estado de falta de respuesta duradera (anergia).

**IIIb. Inducción de tolerancia.** Los mecanismos de inducción de tolerancia por administración oral de antígenos, y más recientemente por vía nasal, explotan la generación de mecanismos reguladores específicos de antígeno, principalmente la deleción y anergia clonal de linfocitos T o el incremento de la producción de IL-10 y TGF $\beta$ , como citoquinas reguladoras y diferenciadoras hacia células T reguladoras. Estos mecanismos son complejos y difíciles de evaluar *in vivo*, y sólo existen referencias indirectas de su funcionamiento.<sup>49</sup> En un estudio realizado

en ratones transgénicos que expresan HLA-DQ8 se observó que la administración intranasal de  $\alpha$ -gliadina recombinante induce una profunda disminución de la producción de IFN $\gamma$  en varios ensayos *in vitro*.<sup>50</sup> Si bien este resultado es muy prometedor, se requiere obtener mayor información sobre si la respuesta observada en ensayos *in vitro* tiene su correlación con lo que sucede en la mucosa intestinal, verificar si es equivalente en humanos, identificar los antígenos tolerogénicos (gliadinas) más apropiados y establecer el plan de inducción de tolerancia (dosis y vía de administración).

### IIIc. Acción sobre los mediadores de la inflamación.

Las citoquinas, producidas por células presentadoras de antígeno y linfocitos activados, tienen un rol fundamental en el control de la respuesta inmune. Al igual que en otras enfermedades inflamatorias crónicas del intestino, como la enfermedad de Crohn, se ha propuesto interferir este proceso mediante anticuerpos neutralizantes de citoquinas.<sup>51</sup> En la mucosa intestinal celíaca, los anticuerpos específicos anti-IFN $\gamma$  podrían ser útiles para modular la respuesta frente al gluten.

La activación de la inmunidad innata por péptidos de gliadinas determina la expresión de IL-15, ciclooxigenasa-2 (COX-2), y marcadores de activación de linfocitos T (CD25) y de células dendríticas (CD83) de la lámina propia.<sup>8</sup> La expresión de IL-15 en el epitelio favorecería la activación y proliferación de linfocitos intraepiteliales, además de controlar la expansión clonal de células T CD8<sup>+</sup> y células NK CD94<sup>+</sup>.<sup>33,52</sup> A su vez, el epitelio se convierte en blanco de citotoxicidad al inducirse la expresión de MICCA en los enterocitos, molécula reconocida por el receptor NKG2D presente en células del compartimento intraepitelial (NK, T  $\gamma/\delta$ , T CD8 $\alpha\alpha^+$ ).<sup>9,53</sup> Por lo tanto, la IL-15 tendría un rol clave en el mecanismo de inmunopatogenia de la EC, ya que promovería la destrucción epitelial y la supervivencia de linfocitos T específicos de gliadinas.

Se ha propuesto el uso terapéutico de anticuerpos neutralizantes anti-IL15, ya que, entre otros efectos, dichos anticuerpos previenen la expresión FAS en el epitelio y por lo tanto, reducen los fenómenos de apoptosis de los enterocitos<sup>54</sup> o inducen la expresión de la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-15, la que produce un bloqueo funcional de la IL-15.<sup>8,55</sup> También podrían utilizarse antagonistas del receptor NKG2D, con el fin de bloquear los fenómenos de apoptosis de los enterocitos.<sup>9,56</sup>

Además del complejo sistema de las citoquinas

presente en la mucosa intestinal de pacientes con EC en actividad, se ha observado un aumento de la expresión de metaloproteinasas (MMP), MMP-1, MMP-12 y TIMP-1, así como una disminución de MMP-2 (que es prevalente en la mucosa normal). La expresión de MMP-12 correlaciona con los niveles de IFN $\gamma$  y con el grado de lesión de la mucosa.<sup>39</sup> Estos resultados condujeron a incluir a agentes inhibidores de metaloproteinasas como candidatos en terapia.

### Conclusiones

Hasta el momento, el único tratamiento disponible para la EC es la dieta exenta de gluten para toda la vida. Aunque el cumplimiento estricto de esta dieta revierte las alteraciones histológicas y la sintomatología, genera un impacto negativo en los parámetros emocionales de muchos pacientes. Es por eso que la búsqueda de tratamientos alternativos, haciendo que la dieta sea más permisiva a pequeñas u ocasionales ingestas de gluten, podría contribuir a mejorar la calidad de vida de los pacientes. El crecimiento constante del conocimiento sobre los eventos moleculares que ocurren en la mucosa intestinal celíaca permite la identificación de posibles dianas susceptibles de modulación o bloqueo funcional, en forma local y específica. Estas estrategias resultan un desafío al desarrollo de nuevas terapias, pero requieren aún numerosas etapas de evaluación de su efectividad e inocuidad.

### Referencias

1. Lundin KE, Scott H, Hansen T, et al. Gliadin-specific, HLA-DQ ( $\alpha 1^*0501$ ,  $\beta 1^*0201$ ) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. *J Exp Med* 1993;178:187-196.
2. Nilsen EM, Lundin KE, Krajci P, et al. Gluten specific, HLA-DQ restricted T cells from celiac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon gamma. *Gut* 1995;37:766-776.
3. Sollid LM. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nature Rev* 2002;2:647-655.
4. Schuppan D, Hahn EG. Gluten and the gut – lessons for immune regulation. *Science* 2002; 297:2218-2220.
5. Arentz-Hansen H, Korner R, Molberg O, et al. The intestinal T cell response to  $\alpha$ -gliadin in adult celiac disease is focused on a single deaminated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J Exp Med* 2000;191:603-612.
6. Anderson RP, Degano P, Godkin AJ, et al. In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as a dominant  $\alpha$ -gliadin T-cell epi-

- tope. *Nat Med* 2000;6:337-342.
7. Qiao SW, Bergseng E, Molberg O, et al. Antigen presentation to celiac lesion-derived T cells of a 33-mer gliadin peptide naturally formed by gastrointestinal digestion. *J Immunol* 2004;173:1757-1762.
  8. Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, et al. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet* 2003;362:30-37.
  9. Hue S, Mention JJ, Monteiro RC, et al. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity* 2004;21:367-377.
  10. Louka AS, Sollid LM. HLA in coeliac disease: unravelling the complex genetics of a complex disorder. *Tissue Antigens* 2003;61:105-117.
  11. Karell K, Louka AS, Moodie SJ, et al. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1\*05-DQB1\*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Hum Immunol* 2003;64:469-477.
  12. Polvi A, Arranz E, Fernández-Arquero M, et al. HLA-DQ2-negative celiac disease in Finland and Spain. *Hum Immunol* 1998;59:169-175.
  13. Greco L, Corazza G, Babron MC, et al. Genome search in celiac disease. *Am J Hum Genet* 1998;62:669-675.
  14. Ciclitira PJ, Ellis HJ. In vivo gluten ingestion in celiac disease. *Dig Dis Sci* 1998;16:337-340.
  15. Ellis HJ, Pollock EC, Engel W, et al. Investigation of the putative immunodominant T cell epitopes in celiac disease. *Gut* 2003;52:212-217.
  16. Fraser JS, Engel W, Ellis HJ, et al. Coeliac disease: in vivo toxicity of the putative immunodominant epitope. *Gut* 2003;52:1698-1702.
  17. Arentz-Hansen H, McAdam SN, Molberg O, et al. Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology* 2002; 123:803-809.
  18. Shan L, Molberg O, Parrot I, et al. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* 2002; 297:2275-2279.
  19. Koning F. The molecular basis of celiac disease. *J Mol Recognit* 2003;16:333-336
  20. Molberg O, Uhlen AK, Jensen T, et al. Mapping of gluten T cell epitopes in the bread wheat ancestors; implications for celiac disease. *Gastroenterology* 2005;128:393-401.
  21. Vader LW, Stepniak DT, Bunnik EM, et al. Characterization of cereal toxicity for celiac disease patients based on protein homology in grains. *Gastroenterology* 2003; 125:1105-1113.
  22. Molberg O, McAdam SN, Korner R, et al. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med* 1998; 4:713-17.
  23. van de Wal Y, Kooy Y, Van Veelen P, et al. Selective deamination by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *J Immunol* 1998;161: 1585-1588.
  24. Vader W, Kooy Y, Van Veelen P, et al. The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides. *Gastroenterology* 2002;122: 1729-1737.
  25. Kim CY, Quarsten H, Bergseng E, et al. Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. *Proc Nat Acad Sci* 2004;101:4175-4179.
  26. Costantini S, Rossi M, Colonna G and Facchiano AM. Modelling of HLA-DQ2 and its interaction with gluten peptides to explain molecular recognition in celiac disease. *J Mol Graph Model* 2005;23:419-431.
  27. Nilsen EM, Jahnsen FL, Lundin KE, et al. Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. *Gastroenterology* 1998;115:551-563.
  28. Troncone R, Gianfrani C, Mazzarella G, et al. The majority of gliadin-specific T cell clones from the coeliac small intestinal mucosa produce both  $\gamma$ -interferon and IL-4. *Dig Dis Sci* 1998;43:156-161
  29. Forsberg G, Hernell O, Melgar S, et al. Paradoxical coexpression of proinflammatory and down-regulatory cytokines in intestinal T cells in childhood celiac disease. *Gastroenterology* 2002;123:667-678.
  30. Monteleone G, Pender SLE, Alstead E, et al. Role of interferon- $\alpha$  in promoting T helper cell type 1 responses in the small intestine in coeliac disease. *Gut* 2001;48:425-429.
  31. Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players of T cell responses. *Immunity* 2003;19:641-644.
  32. Salvati VM, MacDonald TT, Bajaj-Elliott M, et al. Interleukin 18 and associated markers of T helper cell type 1 activity in celiac disease. *Gut* 2002;50:186-190.
  33. Maiuri L, Ciacci C, Auricchio S, et al. Interleukin-15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology* 2000;119:996-1006.
  34. Salvati VM, Mazzarella G, Gianfrani C, et al. Recombinant human interleukin 10 suppresses gliadin dependent T cell activation in ex vivo cultured coeliac intestinal mucosa. *Gut* 2005;54:46-53.
  35. Beckett CG, Dell'Olio D, Kontakou M, et al. Analysis of interleukin -4 and interleukin-10 and their association with the lymphatic infiltrate in the small intestine of patients with coeliac disease. *Gut* 1996;39:818-823.
  36. Lionetti P, Pazzaglia A, Moriondo M, et al. Differing patterns of TGF- $\beta$  expression in normal intestinal mucosa and in active celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 29:308-313.
  37. Chirido FG., Millington OR, Beacock-Sharp H, McI Mowat A. Immunomodulatory Dendritic cells in intestinal lamina propria. *Eur. J Immunol* 2005;35:1831-1840.
  38. Daum S, Bauer U, Foss HD, et al. Increased expression of mRNA for matrix metalloproteinase-1 and -3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in intestinal biopsy specimens from patients with coeliac disease. *Gut* 1999;44:17-25.

39. Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Bauer M, et al. Matrix metalloproteinase pattern in celiac duodenal mucosa. *Lab Invest* 2005;85:397-407.
40. Hill ID, et al. Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;40:1-19.
41. Pietzak MM. Follow-up of patients with celiac disease: achieving compliance with treatment. *Gastroenterology* 2005;128: S135-S141.
42. Case S. The gluten-free diet: how to provide effective education and resources. *Gastroenterology* 2005;128:S128-S134.
43. Sollid LM and Khosla C. Future therapeutic options for coeliac disease. *Nat Clin Pract* 2005;2:140-147.
44. Hausch F, Shan L, Santiago NA, et al. Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G996-G1003.
45. Marti T, Molberg O, Li Q, et al. Prolyl endopeptidase-mediated destruction of T cell epitopes in whole gluten: chemical and immunological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;312:19-26.
46. Molberg O, McAdam SN, Lundin KE, et al. T cells from celiac disease lesions recognize gliadin epitopes deaminated in situ by endogenous tissue transglutaminase. *Eur J Immunol* 2001;31:1317-1323.
47. Sette A, O'Sullivan D, Krieger JI, et al. MHC-antigen-T cell interactions: an overview. *Semin Immunol* 1991;3:195-202.
48. Appel H, Seth NP, Gauthier L, Wucherpfenning KW. Anergy induction by dimeric TCR ligands. *J Immunol* 2001;166:5279-85.
49. Mowat A.McI. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Rev Immunol* 2003;3:331-341.
50. Senger S, Luongo D, Maurano F, et al. Intranasal administration of a recombinant alpha-gliadin down-regulates the immune response to wheat gliadin in DQ8 transgenic mice. *Immunol Lett* 2003;88:127-134.
51. Sandborn WJ and Targan SR. Biologic therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:1592-1608.
52. Mention JJ, Ben Ahmed M, Begue B, et al. Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology* 2003;125:730-45.
53. Cheroutre H, Madakamutil L. Acquired and natural memory T cells join forces at the mucosal front line. *Nat Rev Immunol* 2004;4:290-300.
54. Giovannini C, Matarrese P, Scazzocchio B, et al. Wheat gliadin induces apoptosis of intestinal cells via an autocrine mechanism involving Fas-Fas ligand pathway. *FEBS Lett* 2003;540:117-124.
55. Londei M, Ciacci C, Ricciardelli I, et al. Gliadin as a stimulator of innate responses in celiac disease. *Mol Immunol* 2005;42:913-8.
56. Meresse B, Chen Z, Ciszewski C, et al. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signalling pathway converts CTL into Lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity* 2004;21:357-66.