

Cátedra de Inmunología.

Facultad de Ciencias – Facultad de Química. UDELAR

Los anticuerpos anti-Transglutaminasa tisular y su relación con los problemas reproductivos asociados a la Enfermedad Celíaca

Trabajo de Tesis para acceder al título de Doctora en Ciencias Biológicas

Estudiante: MSc. Cecilia Sóñora

Orientadora: Dra. Ana Hernández

Montevideo

24 de abril 2015.

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas
Programa de Desarrollo de las Ciencias
Básicas (PEDECIBA)

Área Biología
Sub-área Biología Celular y Molecular.

Tutora

Dra. Ana Hernández

Profesora Adjunta

Cátedra de Inmunología

Facultad de Ciencias

UDELAR

Tribunal

Dr. Otto Pritsch

Dra. Rossana Sapiro

Dra. Cecilia Varone

La imagen de la carátula es una reproducción del boceto de Leonardo da Vinci “El feto en el útero” realizado entre los años 1510 y 1513.

Agradecimientos

Para la realización de este trabajo he contado con el apoyo de realmente muchas personas las cuáles, en diferentes momentos y de diferentes maneras, han sido fundamentales para que esta tesis se haya podido concretar

Por lo tanto, quiero manifestar mi mayor agradecimiento

en primer lugar, a Ana por su rol fundamental como guía en mi formación y por haberme apoyado y acompañado constantemente en este camino a través de las interfases, no solo la materno-fetal sino también la básico-clínica, en las que muchas veces no es sencillo navegar

a Claudia y Rosanna por haberme recibido en forma tan cálida y generosa en su laboratorio y guiarme también en este recorrido a medida que profundizábamos en los aspectos vinculados a la Inmunología de la Reproducción

a todos los compañeros que de un lado y otro del charco que me ayudaron con la realización de los experimentos, el análisis de los resultados y sobretodo, que me hicieron sentir parte de dos grupos humanos realmente geniales: de este lado de Plata: Pau, Gus y Claudio y en la otra orilla Lau, Guille, Esteban y Dani

a todos los demás compañeros del Laboratorio de la Cátedra de Inmunología del Instituto de Higiene en particular a los de la casita de adelante: Sylvia, Verónica, Emilia, Marcos, Sebastián, Agustina y Vero y también a Martín, María y Maite que sin ser de la "casita" me dieron una gran mano con la parte de cultivo celular y afines

a las Dras Elena Trucco y Cecilia Montenegro con las cuáles generamos un vínculo colaborativo fundamental a la hora de la recopilación de las muestras clínicas y la discusión de los resultados

a CSIC, PEDECIBA, ANII y AUGM (Programa ESCALA Docente) por el apoyo económico brindado para la realización de este trabajo

a mi familia y mis amigas de siempre por su constante apoyo en todo momento

Índice

Resumen	7
----------------------	----------

Capítulo1

Introducción	10
--------------------	----

1.1 Generalidades de la Enfermedad Celíaca.	10
1.1.1 Definición.	10
1.1.2 Epidemiología.	10
1.1.3 Asociación genética.	11
1.1.4 Inmunopatogenia de la EC.	11
1.1.4.1 Rol patogénico de la tTG en la EC.	13
1.2 Presentaciones clínicas de la EC.	14
1.2.1 Enfermedad celíaca y problemas en la reproducción.	15
1.3 Generalidades de la tTG.	18
1.3.1 Control de la expresión génica de la tTG.	20
1.3.2 Regulación de la actividad de la tTG.	21
1.3.3 tTG y entrecruzamiento de proteínas de la MEC.	24
1.3.4 tTG y señalización mediada por integrinas.	24
1.3.4.1 tTG en la adhesión y migración celular.	25
1.3.4.2 tTG en la fagocitosis.	27
1.3.5 tTG e interacción con receptores de factores de crecimiento.	28
1.3.6 tTG y regulación de la vía de señalización de TGF- β 1.	28
1.3.7 La tTG en la interfase materno-fetal.	29
1.4 Rol de los anticuerpos anti-tTG en la patogenia de la EC.	33
1.4.1 Detección de la unión de anticuerpos anti-tTG a tejidos.	34
1.4.2 Evidencias <i>in vitro</i> del rol de los anticuerpos anti-tTG	34
1.4.3 Efectos <i>in vivo</i> de los anticuerpos anti tTG.	36

Hipótesis	37
------------------------	-----------

Objetivos.....	39
-----------------------	-----------

Capítulo 2

El perfil serológico de autoanticuerpos y las manifestaciones clínicas de la EC: vínculo con la presencia de complicaciones gineco-obstétricas ...	41
--	----

2.1 Análisis de los perfiles de reactividad serológica.	44
2.2 Reactividad serológica contra tTG y tTG unida a FN.	47
2.3 Efectos de los sueros en la actividad de transamidación de la tTG.	48
2.4 Reactividad de los sueros con tejidos placentarios.	49
2.5 Reactividad de los sueros con tejidos tiroideos.	50
Artículo 1	52

Capítulo 3

Efectos de los anti-tTG sobre la funcionalidad de las células trofoblásticas y los macrófagos en un modelo celular *in vitro* representativo de la interfase materno-fetal.....53

3.1 La tTG en el trofoblasto y la modulación de su función por los autoanticuerpos.54

3.2 Efectos de los anticuerpos anti-tTG sobre los macrófagos.58

Artículo 267

Capítulo 4

Los anti-tTG producidos durante la preñez en un modelo de autoinmunidad: efectos sobre la función de los macrófagos68

4.1 Los anticuerpos anti-tTG presentes en el suero de ratones NOD inhiben la actividad de transamidación de la enzima.73

4.2 Los anticuerpos anti-tTG reconocen estructuras del útero gestante....74

4.3 La tTG se expresa en la superficie de los macrófagos y su nivel aumenta durante la gestación.75

4.4 Los anticuerpos anti-tTG inhiben la fagocitosis de células apoptóticas por parte de macrófagos de ratones NOD.75

Artículo 3 77

Capítulo 5

Discusión global y Conclusiones78

Bibliografía96

Lista de abreviaturas 109

Resumen

La enfermedad celíaca (EC) es una patología autoinmune que afecta aproximadamente 1% de la población mundial.

Clásicamente se presenta con manifestaciones digestivas, debilidad y pérdida de peso, pero también suele presentar presentaciones atípicas, donde los síntomas gastrointestinales pueden estar ausentes y en su lugar trastornos extra-intestinales como los problemas gineco-obstétricos pueden ser los más prominentes.

La Transglutaminasa tisular (tTG) es el principal auto-antígeno reconocido por los anticuerpos séricos generados por los pacientes y su detección se utiliza ampliamente como marcador diagnóstico; si bien se ha propuesto su rol en la inmunopatogenia es aún un tema controvertido.

La hipótesis central de este trabajo es que los autoanticuerpos presentes en sangre de los pacientes celíacos pueden afectar la función de la tTG expresada en forma ubicua en el organismo, particularmente de la tTG expuesta en el compartimento extracelular, y que las variaciones individuales en el repertorio de especificidades finas podrían contribuir a la definición de las heterogéneas presentaciones clínicas reportadas.

En particular, nos focalizamos en la tTG del compartimento materno-fetal donde la enzima se expone tanto en estructuras maternas como fetales y participa en varios procesos biológicos, algunos relacionados a su actividad enzimática de transamidación (ensamblaje de proteínas de la MEC y activación de TGF- β 1) y otros en los cuáles participa como co-receptor de integrinas y/o actuando como molécula intermediaria que estabiliza uniones proteicas (adhesión, migración celular y fagocitosis de cuerpos apoptóticos).

Para probar nuestra hipótesis nos propusimos en primer lugar analizar si la presentación clínica de la EC se correlaciona con el perfil de anticuerpos específicos para la tTG, gliadina y otros autoantígenos presentes en los sueros de mujeres celíacas. Posteriormente nos enfocamos en evaluar si los anti-tTG

presentes en sueros de pacientes con complicaciones gineco-obstétricas tenían el potencial de reconocer a la tTG en el compartimento materno-fetal e interferir con la actividad de transamidación y/o con funciones no enzimáticas de la tTG mediante el desarrollo de modelos *in vitro* que incluyeran células trofoblásticas (Swan-71) y macrófagos (THP-1) como representantes de las células participantes en el diálogo molecular en la interfase materno-fetal. Finalmente, para aproximarnos a una situación más cercana a la condición de preñez, nos planteamos analizar el tropismo por el útero gestante y los principales efectos de los anti-tTG derivados de hembras preñadas NOD (ratones diabéticos no obesos), basándonos en la producción espontánea de estos anticuerpos y la ocurrencia de trastornos de la gestación en estos animales.

Nuestros resultados mostraron que gran parte de las pacientes estudiadas presentaba alteraciones del área gineco-obstétrica existiendo una correlación estadísticamente significativa entre la presencia de las mismas y la afectación de la actividad enzimática de tTG *in vitro* en presencia del suero de estas mujeres.

En la siguiente etapa del trabajo encontramos que los anti-tTG del suero de las pacientes celíacas inhibieron la migración de la línea trofoblástica Swan-71 y que además redujeron significativamente su proliferación celular e incrementaron su tasa de apoptosis en relación a lo observado con sueros controles.

Estos autoanticuerpos no solo contribuyeron al daño directo sobre el tejido trofoblástico sino que también interfirieron en la fagocitosis de cuerpos apoptóticos trofoblásticos por parte de las células THP-1 diferenciadas a monocitos/macrófagos y esto sería mediado por un mecanismo que involucra la unión de tTG a MFG-E8.

Estos hallazgos van en la misma línea con los obtenidos en los ratones NOD, en los cuáles los anti-tTG inhibieron la fagocitosis de cuerpos apoptóticos por parte de macrófagos peritoneales de hembras preñadas que mostraron una expresión de tTG en su superficie. Además, la disminución observada de la concentración de anticuerpos anti-tTG circulantes durante la preñez, junto con su capacidad de unirse a estructuras de la interfase materno-fetal indican que estos autoanticuerpos podrían ser retenidos a ese nivel e interferir con las funciones de la enzima allí expresada.

Por lo tanto, los resultados presentados en este trabajo apoyan el rol patogénico de los anti-tTG a nivel de la interfase materno-fetal al inhibir varios procesos claves en los cuáles la tTG está involucrada, ya que no solo contribuyen directamente al daño del tejido trofoblástico sino que también interfieren con el microambiente regulatorio necesario para el normal desarrollo del embarazo.

Introducción

1.1 Generalidades de la Enfermedad Celíaca.

1.1.1 Definición.

La enfermedad celíaca (EC) es una intolerancia total y permanente a proteínas del gluten de los cereales trigo, cebada, centeno y avena en menor grado. Es una enfermedad autoinmune con un fuerte componente genético; tiene origen multifactorial aunque no se conocen completamente los otros factores determinantes del desenlace de la enfermedad en un individuo que expresa los alelos vinculados a la susceptibilidad (HLA DQ2 y DQ8) (Garrote, Gomez-Gonzalez et al. 2008; Meresse, Malamut et al. 2012).

1.1.2 Epidemiología.

La EC afecta aproximadamente al 1% de la población europea y de Estados Unidos (Fasano 2003; Bingley, Williams et al. 2004; Tommasini, Not et al. 2004) mostrando un aumento de la prevalencia en los últimos tiempos (Cataldo and Montalto 2007). En América Latina no existen muchos estudios sobre su prevalencia; a nivel de la población general se dispone de información sobre prevalencia en Brasil (0.5%) (Pratesi, Gandolfi et al. 2003), en Argentina (0.6%) (Gomez, Selvaggio et al. 2001) y en México (0.5-3%) (Remes-Troche, Rios-Vaca et al. 2008).

En Uruguay, de acuerdo a las características de nuestra población se estima que afecta aproximadamente al 1 % de los adultos aunque no se dispone aún de estudios de prevalencia sobre la población adulta; en población hospitalaria pediátrica, los valores alcanzaron el 2% (Mendez V. et al, Prevalence of celiac disease in Uruguayan children: preliminary report. 11th International Symposium on celiac disease. Northern Ireland: Belfast, 2004).

El riesgo de padecer enfermedad celíaca es mucho mayor en los familiares de primer grado (hasta 10%) y en menor medida en los familiares de segundo grado; también su prevalencia es mayor en las personas con Síndrome de Down y otras enfermedades asociadas (Fasano, Berti et al. 2003).

Además, la EC se ha asociado con otras patologías autoinmunes como la Diabetes mellitus tipo 1, la tiroiditis de Hashimoto, el Síndrome de Sjögren, las hepatitis autoinmunes y la enfermedad de Addison (Alaedini and Green 2005). Algunas de estas patologías se presentan con una prevalencia de hasta 10 veces mayor en la población celíaca respecto a la población general (Collin, Salmi et al. 1994; Cuoco, Certo et al. 1999; Briani, Samaroo et al. 2008).

1.1.3 Asociación genética.

La EC está fuertemente asociada con genes HLA (locus CELIAC1, cromosoma 6p21): la mayoría de los pacientes celíacos muestra una variante de la molécula HLA-DQ2 codificada por los alelos DQA1*05 y DQB1*02, y el resto expresan DQ8 (DQA1*03, DQB1*0302) o son portadores de algún alelo aislado del DQ2 (Sollid and Thorsby 1993; Sollid and Lie 2005). Aunque el 25% de la población es portadora de DQ2, solo el 1% desarrolla la EC (Sollid and Lie 2005; Jabri and Sollid 2006).

Estudios de genoma completo han identificado otras regiones que incluyen genes de susceptibilidad, muchos de éstos relacionados con la función inmunitaria (van Heel, Franke et al. 2007) y que podrían compartirse también con otras enfermedades crónicas de base inmunológica, como la diabetes mellitus (Smyth, Plagnol et al. 2008).

1.1.4 Inmunopatogenia de la EC.

Las principales familias de proteínas del gluten de trigo (gliadinas y gluteninas) y sus homólogos en la cebada y centeno, denominadas prolaminas por su alto

contenido en los aminoácidos glutamina y prolina (Shewry and Halford 2002), contienen fragmentos nocivos para el intestino del celíaco. Se han identificado 2 tipos de péptidos: inmunogénicos, que estimulan linfocitos T del intestino o sangre periférica de los pacientes celíacos con restricción DQ2/DQ8, y pueden ser epítopes inmunodominantes (como los residuos 57– 75 de α -gliadina (Anderson, Degano et al. 2000; Arentz-Hansen, McAdam et al. 2002; Vader, Kooy et al. 2002; Kagnoff 2007); y péptidos tóxicos (residuos 31– 43/49) de acción directa sobre el epitelio y células del sistema inmune innato, que son independientes de los linfocitos T (Maiuri, Ciacci et al. 2003; Jabri and Sollid 2006).

Se ha avanzado mucho en el conocimiento de las bases moleculares de esta enfermedad en especial con la identificación de los heterodímeros HLA-DQ2 y DQ8 (correspondientes a los alelos con que se asocia), su papel en la presentación del gluten a los linfocitos TCD4+ específicos (Sollid 2002) y de la acción directa de ciertos fragmentos de las gliadinas sobre el epitelio (Maiuri, Ciacci et al. 2003; Hue, Mention et al. 2004; Meresse, Curran et al. 2006).

La inflamación de la mucosa y el desarrollo de la lesión intestinal a nivel del yeyuno son secundarios a la activación secuencial y la superposición de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa, que conducen a la alteración de la producción local de citoquinas por los linfocitos T locales (Jabri and Sollid 2006; Meresse, Ripoche et al. 2009).

El modelo patogénico mas aceptado integra factores que actúan tanto en el epitelio como en la lámina propia, como la digestión incompleta y el transporte trans-epitelial de péptidos (Shan, Molberg et al. 2002; Matysiak-Budnik, Candalh et al. 2003) el efecto tóxico directo del gluten sobre el epitelio, la proliferación y la activación de linfocitos intraepiteliales (LIE) (Jabri and Sollid 2006; Meresse, Curran et al. 2006) y el reconocimiento de péptidos de gluten por linfocitos T específicos con restricción HLA-DQ2 tras ser modificados por la transglutaminasa tisular (tTG).

La EC activa se caracteriza por atrofia vellositaria a nivel del intestino delgado, gran infiltración de linfocitos T en el epitelio e hiperplasia de las criptas. La

atrofia se explica por una apoptosis descontrolada de los enterocitos y una actividad aumentada de metaloproteinasas de matriz (MMP). Concomitantemente a la apoptosis aumentada, hay incremento de la expresión y de la actividad de tTG en los enterocitos, en células de lámina propia y en la matriz extracelular (MEC) (Ehrmann, Kolek et al. 2003; Esposito, Paparo et al. 2003).

Los principales avances en el conocimiento de las bases de la enfermedad están focalizados en los mecanismos que ocurren a nivel de la lesión intestinal pero existe escasa información sobre los mecanismos patogénicos subyacentes a las manifestaciones extra-digestivas.

1.1.4.1 Rol patogénico de la tTG en la EC.

La EC se ha reconocido como autoinmune porque la tTG (EC 2.3.2.13) fue identificada como el principal auto-antígeno (Dieterich, Ehnis et al. 1997) y la detección de los anticuerpos séricos generados contra ella por los pacientes en el curso de la enfermedad se utiliza ampliamente como marcador diagnóstico (Sblattero, Berti et al. 2000).

Por lo tanto, en la EC la tTG tiene dos funciones indiscutibles: *i.-* es el autoantígeno reconocido con alta especificidad por los autoanticuerpos generados por los pacientes y *ii.-* provoca la deamidación de los péptidos de gliadina, generando neoantígenos que se unen con gran avidez a las moléculas de HLA DQ2 y DQ8 expresadas por la gran mayoría de los pacientes celíacos, lo cual potencia la generación de linfocitos Th1 efectores y memoria, centrales en la perpetuación de la enfermedad (Green and Cellier 2007).

La presencia de IgA específica contra la tTG y los péptidos del gluten es característica de la EC activa. Estos anticuerpos son producidos por plasmocitos a nivel de la lámina propia del intestino (Colombel, Mascart-Lemone et al. 1990; Di Niro, Mesin et al. 2012) y recientemente se ha demostrado que el 10% de los plasmocitos del intestino de pacientes celíacos no tratados producen anticuerpos anti-tTG (Di Niro, Mesin et al. 2012).

Sin embargo, no se conoce aún exactamente por qué los autoanticuerpos se producen en forma específica durante la EC activa y desaparecen de circulación luego de que el paciente adhiere en forma estricta a la dieta libre de gluten, aunque se ha sugerido que esto podría deberse al reconocimiento de la tTG entrecruzada a los péptidos de gluten a través de un mecanismo similar al del modelo hapteno-carrier (Mesin, Sollid et al. 2012).

El tejido de endomisio representó durante mucho tiempo el sustrato ideal para la detección de la auto-reactividad específica de los sueros de pacientes celíacos mediante inmunofluorescencia; se ha demostrado que la reactividad se debe a la interacción de los anticuerpos con la tTG que está depositada en MEC formando complejos con la fibronectina (FN) en ese y en otros tejidos humanos y de roedores (Dieterich, Ehnis et al. 1997; Korponay-Szabo, Sulkanen et al. 2000). En la actualidad la detección de las IgA específicas por técnicas de ELISA es el método más usado en la práctica clínica dado que los test que detectan estos anticuerpos tienen la mayor sensibilidad y especificidad (Rostom, Dube et al. 2005).

1.2 Presentaciones clínicas de la EC.

La presentación clínica de la enfermedad es compleja así como muy variable y tanto la enfermedad como sus síntomas pueden aparecer en cualquier etapa de la vida. Muchos pacientes con enfermedad celíaca tienen síntomas escasos o que se presentan atípicamente, mientras que una minoría de los pacientes padece de síndrome de mala absorción (enfermedad celíaca clásica).

La EC clásica se presenta con síntomas gastrointestinales (diarrea, desnutrición, pérdida de peso, esteatorrea y edema secundario a hipoalbuminemia)(Fasano and Catassi 2012). Sin embargo, las formas no clásicas y/o atípicas, en las cuáles los síntomas gastrointestinales pueden estar ausentes o ser mucho menos severos, se encuentran en forma cada vez más frecuente; en estos casos los hallazgos extra-intestinales como anemia, osteoporosis, alteraciones cutáneas y

dentales y los problemas neurológicos son más comunes (Kemppainen, Kroger et al. 1999; Meloni, Dessole et al. 1999; Ransford, Hayes et al. 2002) (Tabla 1). Aparentemente las mujeres se ven más afectadas por esta patología (Bardella, Fredella et al. 2005) y se han reportado varios trabajos con implicancias de la enfermedad en el ciclo menstrual y la salud reproductiva (Ozgor and Selimoglu 2010; Soni and Badawy 2010). Debido a que las presentaciones atípicas son cada vez más frecuentes, se considera hoy en día a la EC más una patología multisistémica que una afectación únicamente gastrointestinal (Lo, Sano et al. 2003; Murray, Van Dyke et al. 2003).

1.2.1 Enfermedad celíaca y problemas en la reproducción.

Desde hace mucho tiempo se ha reconocido la asociación entre los desórdenes reproductivos humanos y la autoinmunidad. Este concepto se ha visto reforzado por el hallazgo de autoanticuerpos y la presencia de diferentes formas de fallas reproductivas en mujeres clínicamente saludables (Ruiz, Cubillos et al. 1995; Caramaschi, Biasi et al. 2000).

La salud reproductiva puede verse afectada en mujeres con EC no tratada y en algunos casos las complicaciones gineco-obstétricas son las únicas manifestaciones de la enfermedad dentro de las cuáles se incluyen: desórdenes del ciclo menstrual, reducción de la fertilidad, abortos tempranos, restricción del crecimiento intrauterino (IUGR) y recién nacidos de bajo peso (Ozgor and Selimoglu 2010; Soni and Badawy 2010).

Dentro de los desórdenes del ciclo menstrual se han asociado con la EC la menarca tardía (comienzo a los 16 años o posterior) y la menopausia temprana (comienzo a los 45 años o anterior) (Molteni, Bardella et al. 1990; Smecuol, Maurino et al. 1996). También se han reportado complicaciones en la concepción y el embarazo en mujeres celíacas no tratadas (Stazi and Mantovani 2000; Ludvigsson, Montgomery et al. 2005) dentro de las cuales destacan

principalmente los abortos tempranos recurrentes (Gasbarrini, Torre et al. 2000) y los nacimientos prematuros y/o con recién nacidos de bajo peso (Khashan, Henriksen et al. 2010) (Tabla 1).

Se estima que las mujeres con EC no diagnosticada tienen entre 8 y 9 veces mayor riesgo relativo de abortos múltiples y de recién nacidos de bajo peso en comparación con pacientes tratadas. Por otro lado, se encontró que pacientes con infertilidad de causa desconocida, abortos recurrentes o IUGR tienen un riesgo significativamente más alto de padecer EC que la población general (Kumar, Meena et al. 2011; Tersigni, Castellani et al. 2014). Una dieta libre de gluten resulta en una reducción de 9 veces en la tasa de abortos y en una reducción de la prevalencia de recién nacidos de bajo peso desde el 29% hasta 0 (Hill 1990; Tursi, Giorgetti et al. 2008).

Tabla 1. *Principales manifestaciones extra-intestinales de la Enfermedad Celíaca.*

Constitucionales	Anorexia Fatiga
Hematológicas	Anemia ferropénica
Dermatológicas	Alopecia Dermatitis Herpetiforme
Bucales	Hipoplasia del esmalte dental Úlceras recurrentes
Musculo-esqueléticas	Artritis Artrosis Osteopenia/ Osteoporosis
Hepáticas	Alteraciones del enzimograma hepático
Endocrinológicas	Baja estatura Deficiencia de vitamina D Disfunción tiroidea
Neurológicas	Ataxia cerebelosa Neuropatías Desórdenes psiquiátricos Convulsiones
Reproductivas	Alteraciones de la fertilidad femenina menarca tardía amenorrea menopausia temprana infertilidad Alteraciones de la gestación abortos recurrentes partos prematuros restricción del crecimiento intrauterino anomalías en función placentaria disminución del período de lactancia Alteraciones de la fertilidad masculina disfunción gonadal alteración en morfología y motilidad espermática

1.3 Generalidades de la tTG.

La transglutaminasa actualmente designada TG2 o tTG pertenece a una familia de enzimas dependientes de calcio que catalizan modificaciones post-traduccionales de péptidos o proteínas con la formación de enlaces isopeptídicos entre los grupos γ -carboxamida de residuos de glutamina y los grupos ϵ -amino de residuos de lisina presentes en péptidos ó aminas primarias esta acción de entrecruzamiento ó transamidación representa la actividad enzimática más característica de la tTG.

Esta actividad requiere la presencia de la Cys277 que ataca los residuos γ -glutamilo en los sustratos donadores de acilo (proteínas o péptidos) para conducir a la formación de un tioéster intermediario. La enzima acilada resultante puede reaccionar una cadena lateral ϵ -lisina de otra proteína o péptido que se asocia con la enzima en un segundo sitio de unión para el sustrato resultando en la formación de un enlace isopeptídico. Alternativamente y en ausencia de un donador de grupo amino adecuado y un pH ligeramente ácido el tioéster es hidrolizado para formar ácido glutámico en una reacción neta de deamidación (Eckert, Kaartinen et al. 2014) (Figura 1).

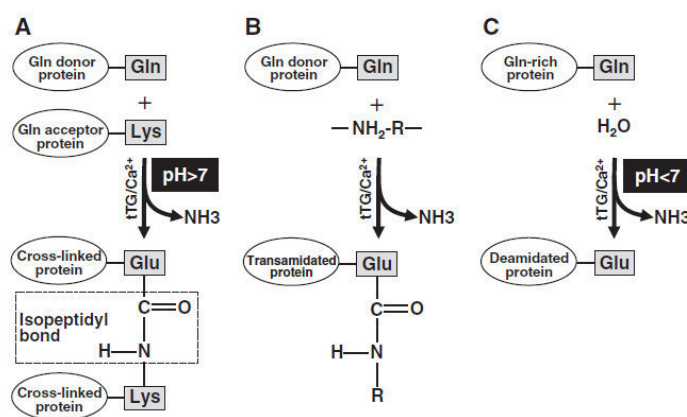


Figura 1. Reacciones bioquímicas dependiente de Ca^{+2} catalizadas por tTG. **A** Entrecruzamiento de proteínas mediante la formación de enlaces isopeptídicos (pH >7). **B** Incorporación de aminas primarias a proteínas (transamidación). **C** Deamidación de glutamina para generar ácido glutámico (en ausencia de aminas o a pH <7). Tomado de *Biochemical functions of tissue transglutaminase (tTG)* (Di Sabatino, Vanoli et al. 2012)

Esta enzima fue inicialmente identificada en 1957 a partir de extractos de hígado de cobayo por su capacidad de catalizar la incorporación a proteínas de aminas primarias de bajo peso molecular (Sarkar, Clarke et al. 1957). Desde su descubrimiento se han identificado más proteínas con esta actividad en organismos unicelulares, invertebrados, peces, mamíferos y plantas (Grenard, Bates et al. 2001). Existen nueve genes que codifican para transglutaminasas (TG) en el ser humano, ocho codifican para enzimas catalíticamente activas (TG 1-7 y el FXIII de la cascada de la coagulación) y el otro para una proteína sin actividad enzimática (la llamada banda proteica 4.2 de la membrana de los eritrocitos)(Grenard, Bates et al. 2001).

Aunque difieren en su secuencia primaria todas las TG (con la excepción de la banda 4.2) comparten una secuencia aminoacídica idéntica en el sitio activo. La mayoría de los tejidos expresan múltiples TG (www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene) que comparten sustratos (Deasey, Shanmugasundaram et al. 2013).

Además de la función de entrecruzamiento de proteínas las TG catalizan modificaciones post-traduccionales de las proteínas vía deamidación, más aún la incorporación de aminas a las proteínas por parte de estas enzimas puede modificar la función, estabilidad e inmunogenicidad de las proteínas modificadas y contribuir a la aparición de las patologías autoinmunes como sucede en la EC (Lorand and Graham 2003).

De las nueve TG descritas en humanos la tTG es la más ampliamente distribuida y la más estudiada.

tTG es una enzima multifuncional ampliamente expresada en la mayoría de los tejidos y en todos los compartimentos celulares (Fesus and Piacentini 2002); juega un rol crítico en el control de la homeostasis celular y tisular, regulando el ciclo celular a través de su participación en la proliferación, diferenciación terminal y la apoptosis (Melino and Piacentini 1998).

Dependiendo del tipo celular y las condiciones del microambiente puede expresarse en todos los compartimentos intracelulares, en la membrana plasmática y en la MEC, mediando una diversidad de funciones biológicas (Thomazy and Fesus 1989; Upchurch, Conway et al. 1991) (Figura 2).

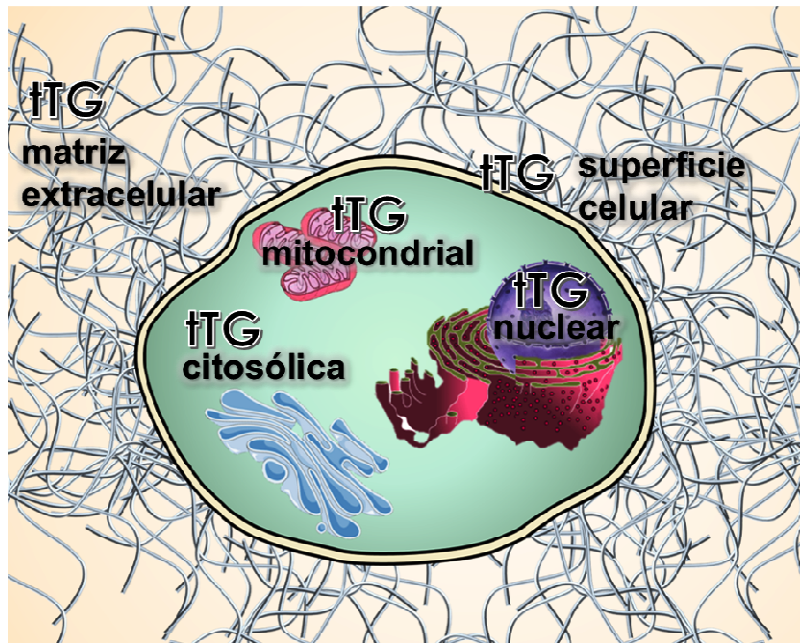


Figura 2. Localización de tTG en los diferentes compartimentos celulares. Modificado de *Transglutaminase 2: A Molecular Swiss Army Knife* (Gundemir, Colak et al. 2012)

Aunque originalmente fue descubierta como una enzima que realiza entrecruzamientos proteicos se han identificado nuevas funciones de esta.

La tTG interactúa con proteínas blanco localizadas a nivel citoplasmático, nuclear, mitocondrial, de la membrana plasmática y de la MEC (Lorand and Graham 2003; Iismaa, Mearns et al. 2009; Park, Choi et al. 2010). En estas diferentes localizaciones la enzima actúa como GTPasa/ATPasa, como adaptador no enzimático, como proteína del scaffold, como regulador de la señalización celular además de catalizar reacciones de transamidación y entrecruzamiento de proteínas.

1.3.1 Control de la expresión génica de la tTG.

La tTG es una enzima fuertemente regulada tanto a nivel transcripcional como traduccional (Lu, Saydak et al. 1995; Kuncio, Tsyganskaya et al. 1998; Feng, Readon et al. 1999).

Desde hace tiempo se conoce el rol de los retinoides estimulando su expresión (Davies, Murtaugh et al. 1985; Piacentini, Ceru et al. 1992; Nagy, Saydak et al. 1996) y esta inducción es controlada por receptores de ácido retinoico (RARs) y receptores X de retinoides (RXRs).

Otros factores que inducen la expresión de esta enzima son: vitamina D, TGF- β 1, IL-6, TNF- α , NF- κ B, epidermal growth factor (EGF), ésteres de forbol y estrés oxidativo. El promotor de la tTG contiene un elemento de respuesta a ácido retinoico a 1.7 kb upstream del sitio de iniciación de la transcripción, un elemento regulatorio en cis específico para IL-6 (4 kb upstream del promotor) un elemento de respuesta a TGF- β 1 (868 bp upstream) y dos elementos de respuesta a AP2-like (634 y 183 bp upstream del sitio de iniciación de la transcripción) (Eckert, Kaartinen et al. 2014).

1.3.2 Regulación de la actividad de la tTG.

Estructuralmente la tTG está compuesta de cuatro dominios: un sandwich β aminoterminal que contiene los sitios de unión a integrinas y FN, un dominio central catalítico para la reacción de transferencia de acilo con una tríada catalítica (Cys277, His335, y Asp358) y dos barriles β carboxilo-terminales (Figura 3).

Además de la modificación post-traducciona de proteínas dependiente de Ca^{+2} esta enzima puede unir e hidrolizar GTP y actuar como proteína G (Lorand and Graham 2003).

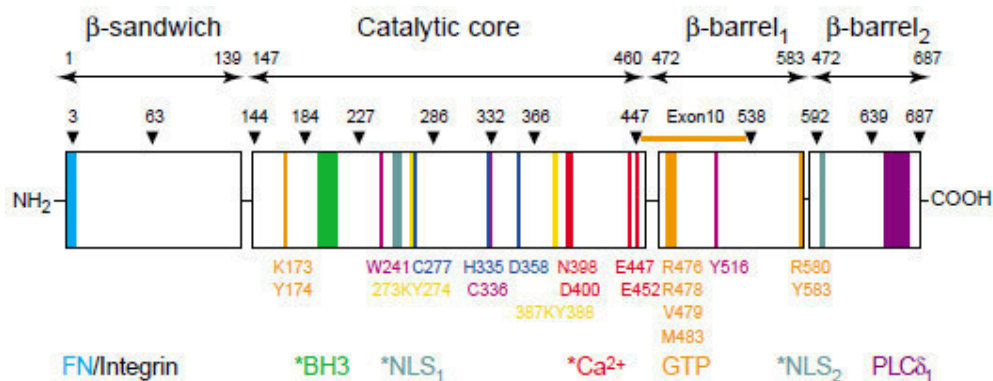


Figura 3. Representación esquemática de los cuatro dominios estructurales y las regiones funcionales de la tTG.

Tomado de *Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions* (Fesus and Piacentini 2002)

El arreglo espacial de los cuatro dominios de la tTG es alterado por sus interacciones con cofactores, la forma unida a GDP/GTP muestra una considerable interacción entre el dominio catalítico y los dominios 3 y 4 lo que genera que la tTG adopte una conformación cerrada o compacta, esto reduce la accesibilidad y actividad del sitio transamidante dependiente de Ca^{+2} (Liu, Cerione et al. 2002).

Por el contrario, la unión del Ca^{+2} altera la conformación separando los dominios 3 y 4 permitiendo que la enzima adquiera una conformación abierta/extendida que expone el sitio catalítico, esta conformación es la que se asocia con la reacción de entrecruzamiento o transferencia de acilo (Pinkas, Strop et al. 2007).

Las TG se encuentran en ambientes intra y extracelulares y en estas localizaciones su actividad es estrictamente regulada por las diferentes condiciones existentes. Por ejemplo, el Ca^{+2} , los nucleótidos de guanidina y el potencial redox modulan la actividad de entrecruzamiento de la tTG.

La tTG forma enlaces disulfuro intramoleculares que son necesarios para la actividad de transamidación (Folk and Cole 1966; Boothe and Folk 1969) y se han descrito transiciones entre el estado reducido (activo) y oxidado (inactivo) (Stamnaes, Pinkas et al. 2010; Jin, Stamnaes et al. 2011). Esto involucra una

tríada de residuos de cisteína (Cys370, Cys371, y Cys230) que tienen un potencial redóx inusualmente alto (Jin, Stamnaes et al. 2011). Bajo condiciones oxidantes se forma un enlace disulfuro entre Cys230 y Cys370 que facilita la formación del enlace disulfuro más estable Cys370-Cys371. Estos eventos inactivan la actividad transamidante de la tTG (Pinkas, Strop et al. 2007; Stamnaes, Pinkas et al. 2010). Por el contrario la reducción de la tTG genera una conformación abierta de la misma (Stamnaes, Pinkas et al. 2010).

Otro factor que contribuye a la inactivación de la tTG a nivel extracelular es el óxido nítrico (NO) que conduce a la nitrosilación de varios residuos de cisteína de la enzima (Lai, Hausladen et al. 2001). *In vivo*, la gradual disminución durante el envejecimiento de la biodisponibilidad del NO incrementa la actividad de transamidación de la tTG en los vasos sanguíneos e incrementa la rigidez de los mismos por la acumulación de entrecruzamientos en la MEC vascular (Santhanam, Tuday et al. 2010; Jung, Jandu et al. 2013).

Además la fosforilación de la tTG por parte de la Protein Kinasa A (Ser 216) estimula la actividad kinasa de la tTG mientras inhibe la función de transamidación (Mishra and Murphy 2006; Mishra, Melino et al. 2007). Por el otro lado las tiol reductasas como la tioredoxina activan la tTG extracelular antagonizando entonces la inactivación por oxidación a nivel del medio extracelular (Jin, Stamnaes et al. 2011).

Actuando en conjunto, todos estos factores modulan los estados redox, de nitrosilación y de fosforilación de la tTG controlando su actividad de transamidación.

Además las interacciones proteína-proteína son capaces de regular dicha actividad, a nivel de la MEC la enzima interactúa con varias proteínas incluyendo FN, osteonectina e integrinas (Zemskov, Janiak et al. 2006) y la interacción con algunas de ellas altera la actividad enzimática (Turner and Lorand 1989).

1.3.3 tTG y entrecruzamiento de proteínas de la MEC.

Muchas de las funciones de la tTG como ser la estabilización de la MEC y la reparación tisular son mediadas por la actividad de transamidación que resulta en el entrecruzamiento de varias proteínas que son sustrato de esta enzima (Aeschlimann and Thomazy 2000).

La tTG y el FXIIIa se liberan al ambiente extracelular a través de un mecanismo atípico de secreción todavía no dilucidado completamente (Cordell, Kile et al. 2010; Zemskov, Mikhailenko et al. 2011) y allí modifican en forma covalente proteínas de la MEC para formar homo y heteropolímeros que potencian la estabilidad de la MEC (Aeschlimann and Thomazy 2000; Lorand and Graham 2003). Este entrecruzamiento incrementa la rigidez de la FN (Nelea, Nakano et al. 2008) y de las fibras de colágeno (Spurlin, Bhadriraju et al. 2009). La interacción de tTG con FN tiene una alta afinidad y la enzima está involucrada en su ensamblaje (Upchurch, Conway et al. 1991).

1.3.4 tTG y señalización mediada por integrinas.

Las integrinas son receptores transmembrana importantes en los procesos de adhesión y señalización que aunque carecen de actividad enzimática intrínseca regulan muchas vías de señalización intracelular y se activan al unirse a la MEC (Hynes 2002). La tTG interactúa con la MEC para potenciar la adhesión celular y la señalización mediada por integrinas vía su interacción directa con las integrinas $\beta 1$, $\beta 3$, y $\beta 5$ (Zemskov, Janiak et al. 2006; Belkin 2011) participando como co-receptor para la FN (Akimov, Krylov et al. 2000) (Figura 4).

El incremento de la rigidez de la MEC potencia la adhesión de fibroblastos y osteoblastos (Chau, Collighan et al. 2005; Forsprecher, Wang et al. 2009) y favorece la supervivencia, el crecimiento, la migración y la diferenciación celular influyendo en vías de señalización mediadas por integrinas (Bershadsky, Kozlov et al. 2006).

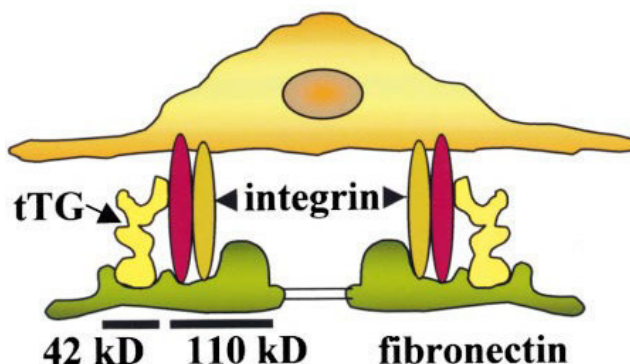


Figura 4. Representación esquemática del rol de la tTG en la adhesión celular mediante su interacción con FN e integrinas. Tomado con modificaciones de *Tissue Transglutaminase Is an Integrin-binding Adhesion Coreceptor for Fibronectin* (Akimov, Krylov et al. 2000)

1.3.4.1 tTG en la adhesión y migración celular.

A nivel de la membrana plasmática, la enzima se encuentra asociada a las integrinas esta función es importante para la adhesión, migración celular, extravasación y también para el ensamblaje de la FN (Aeschlimann and Thomazy 2000; Akimov and Belkin 2001).

La unión integrina-FN es una interacción débil, mientras que la tTG interactúa fuertemente con ambas estabilizando la unión integrina-FN lo cuál facilita la adhesión celular a la MEC y activa la señalización mediada por integrinas (Belkin 2011). El efecto de la tTG en la función de las integrinas se evidencia por su impacto en el clustering de las mismas (Janiak, Zemskov et al. 2006). Aún no se conoce el mecanismo exacto a través del cuál la enzima promueve dicho clustering, sin embargo la capacidad de la tTG de oligomerizar e interactuar proteínas de unión a integrinas como la caveolina-1 y las tetraespaninas podría promover este fenómeno. El clustering de integrinas inducido por la tTG potencia la señalización celular dependiente de estas moléculas (Akimov, Krylov et al. 2000; Janiak, Zemskov et al. 2006). Esto incluye la activación de FAK, Src, y

p190RhoGAP y el aumento en la expresión de RhoA unida a GTP y su blanco molecular ROCK. El impacto neto de estos eventos es un aumento en la formación de adhesiones focales y de fibras de estrés de actina lo que potencia la contractilidad de la actino-miosina.

Syndecan-4, un proteoglicano con heparán sulfato, se localiza en puntos de contacto entre las células y la MEC donde interactúa, a través del heparán sulfato, con la región Hep-2 de la FN. Esta molécula colabora con las integrinas para potenciar la adhesión celular a la FN y facilitar el desarrollo adhesión dependiente (mediado por RhoA) de adhesiones focales, fibras de estrés y la contractilidad de la actino-miosina (Xian, Gopal et al. 2010). Syndecan-4 es una molécula importante de unión a la tTG (Telci, Wang et al. 2008; Scarpellini, Germack et al. 2009), la enzima posee un sitio de unión a heparán sulfato, 261LRRWK265, que media esta interacción (Verderio, Scarpellini et al. 2009). La interacción de alta afinidad de la tTG extracelular con syndecan-4 activa la protein kinasa Ca (PKCa) que a su vez se une directamente a la cola citoplasmática de la integrina $\beta 1$. Esta interacción controla los niveles de integrinas, su distribución en la superficie celular así como la estimulación por parte de estas de FAK y ERK1/2 (Parsons, Keppler et al. 2002; Telci, Wang et al. 2008; Scarpellini, Germack et al. 2009; Wang, Collighan et al. 2010; Wang, Telci et al. 2011).

Por lo tanto, la expresión aumentada de la tTG durante la reparación tisular probablemente favorezca la adhesión celular y la señalización a los efectos de incrementar la adhesión dependiente de integrinas y el ensamblaje de la matriz de FN (Verderio, Telci et al. 2003; Telci and Griffin 2006; Wang and Griffin 2012). Esto promueve el clustering de las moléculas que se unen a la tTG sobre la superficie celular para potenciar la adhesión, prevenir el anoikis y facilitar la supervivencia celular.

1.3.4.2 tTG en la fagocitosis.

A través de la interacción con integrinas la tTG interviene en el proceso de fagocitosis de células apoptóticas al mediar una señalización eficiente vía integrina $\beta 3$ para la formación de la copa fagocítica. La tTG de superficie de los macrófagos proporciona una señalización eficiente de la integrina $\beta 3$ alrededor de las células apoptóticas ya sea promoviendo el clustering de la misma o potenciando la afinidad del receptor por su ligando MFG-E8/fosfatidilserina (Toth, Garabuczi et al. 2009). La estabilización del complejo integrina $\beta 3$ -MFG-E8 medida por la enzima mejora la captación de las células apoptóticas.

La tTG también activa blancos moleculares de la cascada de señalización iniciada por la activación de la integrina $\beta 3$ que incluyen a RhoG y Rac1 los cuáles son necesarios para que se dé una fagocitosis eficiente.

Las principales evidencias de esto surgen de trabajos desarrollados en el modelo de animales knockout para tTG (De Laurenzi and Melino 2001; Nanda, Iismaa et al. 2001). Los ratones tTG $-/-$ desarrollan autoinmunidad con glomerulonefritis mediada por inmunocomplejos (Szondy, Sarang et al. 2003; Hanayama, Miyasaka et al. 2006).

Los macrófagos tTG $-/-$ presentan problemas en la fagocitosis debido a la acumulación alterada de integrina $\beta 3$ en los portales fagocíticos (Toth, Garabuczi et al. 2009). De hecho la sobre-expresión de la integrina $\beta 3$ en los macrófagos tTG $-/-$ restaura parcialmente la fagocitosis (Toth, Sarang et al. 2009).

En relación a los fenómenos de clearance de cuerpos apoptóticos, la tTG también está involucrada en la señalización de otros receptores scavenger como LRP1 y LDRR (Zemskov, Mikhailenko et al. 2007).

1.3.5 tTG e interacción con receptores de factores de crecimiento.

La asociación física entre integrinas y receptores tirosina-kinasas es necesaria para la respuesta celular a la MEC y los factores de crecimiento solubles (Yamada and Even-Ram 2002).

La tTG interactúa con el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) en la superficie de fibroblastos y células de músculo liso vascular potenciando la interacción de éste con integrinas haciendo de puente entre estos receptores en la superficie celular (Zemskov, Loukinova et al. 2009; Zemskov, Mikhailenko et al. 2012). La interacción con la tTG promueve el clustering de los PDGFR, su activación y la señalización intracelular que esta desencadena. Estos hechos también sugieren que la actividad de la tTG puede tener un rol pro-inflamatorio en la reparación tisular, la fibrosis celular, la restenosis vascular y la metástasis tumoral, o sea diferentes respuestas fisiopatológicas que frecuentemente involucran la sobreactivación o desregulación del eje de señalización mediada por PDGF/PDGFR (Heldin and Westermark 1999).

La interacción de esta enzima con los receptores de factores de crecimiento podría ser un fenómeno general dado que la tTG también se une al vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) en la superficie de las células endoteliales y modula la señalización por VEGF (Dardik and Inbal 2006). En este caso la enzima entrecruza VEGFR para formar complejos de alto peso molecular.

1.3.6 tTG y regulación de la vía de señalización de TGF- β 1.

Las modificaciones inducidas por la tTG pueden afectar la actividad de los factores de crecimiento en el ambiente extracelular (Lorand and Graham 2003; Ientile, Caccamo et al. 2007; Wang, Telci et al. 2011).

TGF- β 1 es un regulador clave de la remodelación de la MEC (Worthington, Klementowicz et al. 2011) y su activación involucra integrinas, proteasas y es influenciada por el ambiente oxidativo y el estrés mecánico

Otra acción biológica relevante de la tTG asociada al proceso del clearance de cuerpos apoptóticos y reparación tisular, es mediar la activación de la citoquina anti-inflamatoria TGF- β 1, la cual es secretada por los macrófagos como un complejo inactivo que es incorporado a la MEC por la actividad de entrecruzamiento de la tTG la cuál por lo tanto controla la maduración y la actividad de esta citoquina (Verderio, Gaudry et al. 1999; Wang and Griffin 2012).

Además, en los fibroblastos la tTG incrementa la expresión a nivel de ARNm y de proteína de TGF- β 1 a través del factor de transcripción NF- κ B (Telci, Collighan et al. 2009).

A su vez, TGF- β 1 incrementa la expresión de la tTG en varios tipos celulares apoptóticos (Fukuda, Kojiro et al. 1994; Priglinger, Alge et al. 2004). El promotor de la tTG de ratón contiene un elemento de respuesta para TGF- β 1 a 868 bp upstream del sitio de inicio de la transcripción (Ritter and Davies 1998). Esto resulta en un bucle de retroalimentación positiva en el cuál TGF- β 1 y tTG generan una activación recíproca de su expresión (Belkin 2011).

1.3.7 La tTG en la interfase materno-fetal.

El embarazo constituye un proceso estrictamente regulado donde actúan en sincronía mecanismos sistémicos y locales para permitirle al sistema inmunológico materno tolerar al feto. Desde las primeras etapas de la implantación del embrión se establecen diálogos moleculares altamente coordinados y regulados que implican estructuras maternas y fetales.

Para recibir al blastocisto el endometrio sufre alteraciones estructurales y funcionales bajo la influencia de las hormonas reproductivas.

Al llegar a la cavidad uterina el blastocisto establece interacciones débiles con el epitelio endometrial (Figura 5), esta aposición puede ocurrir durante un período de tiempo limitado conocido como ventana de implantación, que es cuando el endometrio se halla en estado receptivo. Luego de la aposición viene la fase de adhesión donde se establecen contactos estrechos entre las células trofoblásticas del blastocisto y el epitelio endometrial mediados por un grupo característico de moléculas de adhesión en ambos tipos celulares y por último se da la etapa de implantación donde es el trofoblasto el que promueve la invasión de dicho epitelio (Norwitz, Schust et al. 2001).

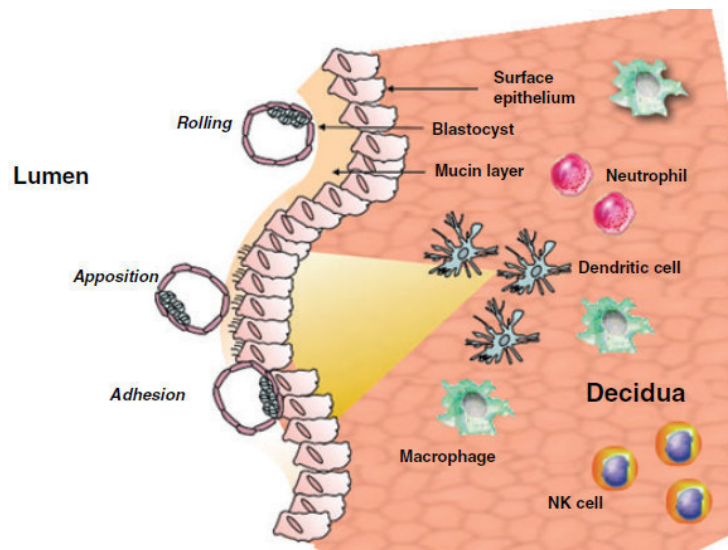


Figura 5. *Implantación del blastocisto en el endometrio receptivo.*
Tomado de *Inflammation and Implantation* (Dekel, Gnainsky et al. 2010)

Las células del trofoblasto fetal que están en contacto directo con las células de la madre juegan un rol central en los mecanismos de tolerancia desarrollados en la interfase y aseguran el buen progreso del embarazo. Por otra parte, el epitelio del endometrio modificado (decidualizado) es infiltrado por una gran cantidad de leucocitos de la madre que median los mecanismos de tolerancia inmunológica asociados (Figura 5). En esta interfase hay secreción de una gran variedad de sustancias inmunomoduladoras, incluyendo hormonas y citoquinas. Por lo tanto, los eventos de migración y adhesión celular en la interfase materno-fetal son muy importantes desde las etapas tempranas del embarazo. Además, la

remodelación de la MEC, la angiogénesis, la apoptosis controlada y la remoción (clearance) de los cuerpos apoptóticos representan otros procesos centrales en dicha interfase (Norwitz, Schust et al. 2001).

La constitución de la interfase materno-placentaria durante los procesos de deciduización del endometrio uterino e invasión trofoblástica involucra una respuesta pro-inflamatoria acompañada por una profunda remodelación tisular (Abrahams, Visintin et al. 2005; Dekel, Gnainsky et al. 2010). El embrión tiene que atravesar el revestimiento epitelial del útero para implantarse dañando el tejido endometrial para invadir y reemplazar el endotelio y el músculo liso de los vasos sanguíneos maternos (Weiss, Goldsmith et al. 2009; Mor and Cardenas 2010; Warning, McCracken et al. 2011). La respuesta inflamatoria que caracteriza el período peri-implantación será fisiológicamente limitada por mecanismos regulatorios y tolerogénicos que involucran respuestas de la inmunidad innata y adaptativa (Aluvihare, Kallikourdis et al. 2004; Terness, Kallikourdis et al. 2007; Guerin, Prins et al. 2009) (Figura 6). De esta manera poblaciones leucocitarias incluyendo subpoblaciones de células T, células Natural Killers uterinas (uNK), macrófagos y células dendríticas junto con mediadores proinflamatorios llamados en conjunto BIEFs (blastocyst implantation essential factors) contribuyen a la regulación de esta red (Aluvihare, Kallikourdis et al. 2004; Terness, Kallikourdis et al. 2007; Guerin, Prins et al. 2009; Leber, Teles et al. 2010; Saito, Nakashima et al. 2010; Ramhorst, Fraccaroli et al. 2012).

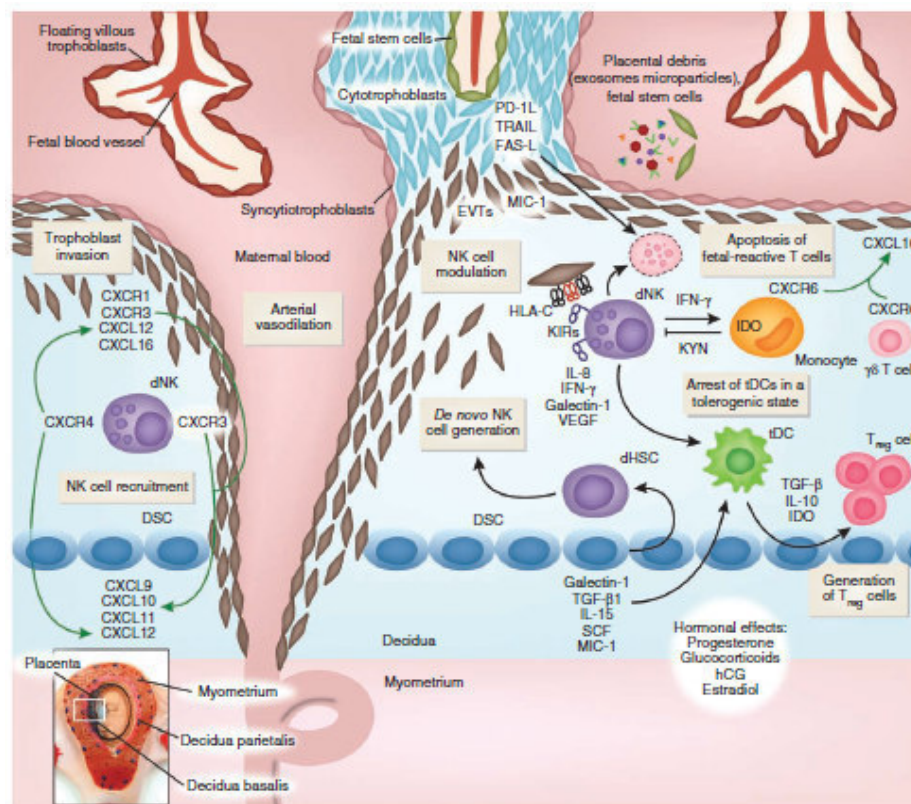


Figura 6. Principales mecanismos involucrados en la tolerancia inmunológica al feto durante el primer trimestre de la gestación humana. Tomado de *Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health*(Arck and Hecher 2013)

En particular los macrófagos constituyen el 20-30% de las células inmunológicas de la decidua y se encuentran activados en un perfil regulador con funciones tolerogénicas y de reparación de heridas (Nagamatsu and Schust 2010; Ambarus, Krausz et al. 2012)

De hecho, las células apoptóticas de músculo liso, endoteliales y trofoblásticas son removidas eficientemente por los macrófagos deciduales para prevenir una respuesta inflamatoria deletérea. Por lo tanto el inmediato clearance de células apoptóticas induce el fenotipo de macrófagos deciduales inmuno-regulador que producen IL-10 y TGF- β 1 (Fest, Aldo et al. 2007; Mantovani, Biswas et al. 2013).

Por lo tanto una producción exagerada de cuerpos apoptóticos y/o un ineficiente clearance de estos puede contribuir a la desregulación de la respuesta

inflamatoria durante la implantación y puede ser una causa subyacente de complicaciones de la gestación (Abrahams, Kim et al. 2004).

La tTG se expresa en la interfase materno-fetal (Hager, Gliemann et al. 1997; Kabir-Salmani, Shiokawa et al. 2005; Robinson, Glazier et al. 2006) A nivel uterino se expresa en los sitios de receptividad (pinopodios), que son los sitios del epitelio donde se ve favorecida la interacción con el trofoblasto; la tTG expresada en estos sitios, interactuaría con la FN fetal, que en su forma secretada es considerada una molécula adhesiva clave en el proceso de implantación (Bentin-Ley, Sjogren et al. 1999).

Respecto a las estructuras fetales, se describió la expresión superficial de tTG en células primarias y líneas celulares derivadas de placenta (Robinson, Glazier et al. 2006) en la línea de coriocarcinoma JEG-3 considerada como modelo de sinciotrofoblasto (Blanchon, Sauvart et al. 2002) y en cultivos primarios de trofoblastos extravellositario. La enzima asociada a la membrana del sinciotrofoblasto está involucrada en el entrecruzamiento de la FN y la adhesión celular (Robinson, Glazier et al. 2006) y en la estabilización del material particulado que se produce por brotación a partir de la placenta (Robinson, Baker et al. 2007).

Por lo tanto, y de acuerdo a los antecedentes descritos anteriormente respecto a las funciones biológicas de la tTG y a su localización ubicua, es altamente probable que esté involucrada en el proceso de implantación embrionaria y en la regulación del funcionamiento de la placenta al mediar varios procesos biológicos a este nivel.

1.4 Rol de los anticuerpos anti-tTG en la patogenia de la EC.

El rol de los autoanticuerpos en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes es complejo y varía entre las diferentes patologías. Los autoanticuerpos pueden interferir específicamente con las actividades biológicas del antígeno pero

también pueden formar inmunocomplejos que activen mecanismos del sistema inmunológico que originen daño tisular.

Si bien es cierto que no existe consenso sobre los efectos de los anticuerpos anti-tTG en la EC la evidencia disponible sugiere que no serían meramente un fenómeno colateral sino que podrían contribuir a la patogenia (Alaedini, Xiang et al. 2008).

1.4.1 Detección de la unión de anticuerpos anti-tTG a tejidos.

En los pacientes celíacos la tTG en los compartimentos extracelulares es reconocida por autoanticuerpos; se ha detectado la deposición de anticuerpos IgA específicos contra la tTG asociados a la red de FN en muestras de yeyuno (Korponay-Szabo, Halttunen et al. 2004) y la co-localización de anticuerpos IgA en otros órganos como hígado, músculo, tiroides, cerebro y corazón indica que la tTG es accesible para los anticuerpos circulantes que se hayan generado a nivel intestinal (Korponay-Szabo, Halttunen et al. 2004; Sategna-Guidetti, Franco et al. 2004; Hadjivassiliou, Maki et al. 2006; Naiyer, Shah et al. 2008).

1.4.2 Evidencias *in vitro* del rol de los anticuerpos anti-tTG .

La respuesta de autoanticuerpos de los celíacos es heterogénea; las IgA son producidas contra diferentes regiones funcionales de la molécula de tTG y la mayor parte de los pacientes posee autoanticuerpos dirigidos contra más de un epítipo (Seissler, Wohlrab et al. 2001; Nakachi, Powell et al. 2004); por lo tanto el repertorio individual de especificidades finas de anticuerpos anti-tTG podría condicionar la presentación clínica de la enfermedad contribuyendo a la aparición de diferentes síntomas extra-digestivos.

La inhibición de la función de la tTG por anticuerpos específicos se ha reportado en diferentes ensayos *in vitro*, sugiriendo que los anticuerpos anti-tTG podrían estar involucrados en la patogénesis (Tabla 2); se ha probado que dichos anticuerpos pueden afectar la actividad enzimática (Kiraly, Vecsei et al. 2006;

Anjum, Baker et al. 2009), la permeabilidad endotelial (Myrsky, Caja et al. 2009), la angiogénesis (Myrsky, Kaukinen et al. 2008; Di Simone, De Spirito et al. 2013) y la diferenciación y proliferación celular (Halttunen and Maki 1999; Barone, Caputo et al. 2007).

De un tiempo a esta parte han surgido evidencias de que los anticuerpos anti-tTG pueden tener un rol patogénico en las alteraciones gineco-obstétricas (Kieft-de Jong, Jaddoe et al. 2013). Los indicadores indirectos que apoyarían un rol de estos anticuerpos en los procesos reproductivos se basan en el reconocimiento de la enzima a nivel de la superficie celular en cortes de placentas humanas por autoanticuerpos anti-tTG provenientes de celíacos (Anjum, Baker et al. 2009).

Además recientemente se han encontrado evidencias de que los autoanticuerpos dirigidos contra la tTG favorecen la apoptosis a nivel del trofoblasto (Di Simone, Silano et al. 2010) e inhiben la angiogénesis a nivel endometrial (Di Simone, De Spirito et al. 2013)

Tabla 2. *Efectos Biológicos de los anticuerpos dirigidos contra tTG.*

Efecto	Referencia
<i>In vitro</i>	
Inhibición de actividad de transamidación sobre enzima purificada	Kiraly, 2006
Inhibición de actividad de transamidación en tejidos placentarios	Anjum, 2009
Aumento de proliferación celular	Barone, 2007
Inhibición de diferenciación celular	Haittunen, 1999
Aumento de permeabilidad epitelial	Zanoni, 2006
Aumento de permeabilidad vascular	Myrsky, 2009
Inhibición angiogénesis	Myrsky, 2008; Caja 2010; Di Simone, 2013
Inducción apoptosis neuronal	Cervio, 2007
Inducción apoptosis trofoblasto	Di Simone, 2010
<i>In vivo</i>	
Inducción de ataxia	Boscolo, 2010
Inhibición angiogénesis	Kalliokoski, 2013

1.4.3 Efectos *in vivo* de los anticuerpos anti tTG.

Las dificultades para profundizar en la relevancia *in vivo* de estos fenómenos radican en la carencia de un modelo *in vivo* para la EC que reproduzca simultáneamente la lesión intestinal y la presencia de autoanticuerpos específicos en sangre (Marietta, Black et al. 2004).

Sin embargo, se ha reportado que en ratones la administración de anticuerpos dirigidos contra la tTG provoca que los mismos sean reclutados a nivel del sistema nervioso central generando ataxia en estos animales (Boscolo, Lorenzon et al. 2010) y que también se vea inhibida *ex vivo* e *in vivo* en forma importante el proceso de angiogénesis en diferentes cepas de ratones (Kalliokoski, Sulic et al. 2013) (Tabla 2)

Recientemente se ha podido reproducir en parte la lesión intestinal característica de la EC mediante la administración intra-peritoneal, en ratones atímicos, de IgG total con altos títulos de anti-tTG provenientes de pacientes celíacos, observándose en estos animales disminución de la relación altura de la vellosidad/ profundidad de la cripta, depósito específico de los anti-tTG a nivel de varios tejidos incluyendo el intestino y además aparición de síntomas gastrointestinales (Kalliokoski, Caja et al. 2015).

Sin embargo, no existen a la fecha reportes de modelos animales en los que se estudie la función reproductiva en presencia de anticuerpos dirigidos contra la tTG.

Hipótesis

Nuestra hipótesis central de trabajo es que los autoanticuerpos presentes en la sangre de los pacientes celíacos pueden afectar la función de la tTG expresada en forma ubicua en el organismo y en su forma expuesta al sistema inmune es decir fundamentalmente las formas asociadas a la membrana plasmática y/o a la MEC.

Un compartimento que resulta particularmente interesante es la interfase materno-fetal, donde la enzima se expresa tanto en las estructuras maternas como fetales. La tTG en la interfase materno-fetal participaría en varios procesos, algunos relacionados a su actividad enzimática de transamidación (ensamblaje de proteínas de MEC y activación de TGF- β 1) y otros en los cuáles actúa como co-receptor de integrinas y/o haciendo de molécula intermedia que estabiliza uniones proteicas (adhesión y migración celular). Además, a través de su interacción con β integrinas la tTG participa en el diálogo molecular establecido entre las células fagocíticas y los cuerpos apoptóticos promoviendo el clearance eficiente de los mismos. En este contexto, se plantea que los anticuerpos podrían interferir con las interacciones moleculares mediadas por la tTG, alterando el proceso y conduciendo a inflamación crónica con consecuencias sobre el desarrollo fetal.

En este marco conceptual, consideramos importante abordar en tres etapas el estudio de los efectos de los anticuerpos anti-tTG; en primera instancia realizando un estudio de correlación entre las características y algunas propiedades funcionales de los autoanticuerpos con los patrones clínicos observados en una población de mujeres celíacas adultas (con particular énfasis en los problemas reproductivos asociados); en segundo lugar analizando los efectos de estos anticuerpos utilizando modelos celulares representativos de la interfase materno-fetal; por último nos interesó aproximarnos a la condición de preñez en presencia de autoanticuerpos circulantes, analizando el efecto de los

anticuerpos anti-tTG producidos espontáneamente en una cepa de ratones con background autoinmune.

En suma, se propone que la presencia en sangre de anticuerpos dirigidos contra motivos que involucren uno o más dominios funcionales de la tTG, podrían estar afectando algunos de los procesos mencionados anteriormente al acceder a la interfase materno-fetal, condicionando el progreso de la implantación y el embarazo.

En base a los resultados obtenidos, se profundizará en alguno de los mecanismos moleculares implicados en los procesos que eventualmente se vean afectados por lo anticuerpos anti-tTG.

Objetivos

Objetivo general.

El objetivo general consiste en aportar a la comprensión de los mecanismos inmunopatogénicos involucrados en la enfermedad celíaca y particularmente aquellos que afecten la salud reproductiva de las pacientes.

Objetivos específicos.

1. Analizar si la presentación clínica de la EC se correlaciona con el perfil de anticuerpos específicos para la tTG, gliadina y otros autoantígenos.
2. Evaluar si los anticuerpos anti tTG presentes en los sueros de mujeres celíacas con complicaciones gineco-obstétricas, tienen el potencial de reconocer a la tTG en el compartimento materno-fetal e interferir con la actividad de transamidación y/o con funciones no enzimáticas de la tTG, mediante el desarrollo de modelos *in vitro* que incluyan células trofoblásticas y leucocitos mononucleares como tipos celulares participantes en el diálogo molecular en la interfase materno-fetal.
 - a. Las funciones a estudiar en células trofoblásticas son: migración, adhesión, proliferación y apoptosis.
 - b. Las funciones a estudiar en macrófagos utilizados como modelo de células de la decidua son: fagocitosis de células apoptóticas y producción de mediadores solubles.

3. Analizar el tropismo por el útero gestante y los principales efectos de los anticuerpos anti-tTG derivados de hembras preñadas de la cepa NOD, basándonos en la producción espontánea de estos anticuerpos y la ocurrencia de trastornos de la gestación en estos animales.
4. Profundizar en los posibles mecanismos moleculares implicados en los procesos afectados por los autoanticuerpos y proponer un modelo patogénico.

Para cumplir con los objetivos 2 - 4 fue fundamental la colaboración establecida con las Dras. Claudia Pérez-Leirós y Rosanna Ramhorst y las pasantías realizadas en el Laboratorio de Inmunofarmacología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA. En particular, el grupo trabaja con las células Swan-71 (no disponibles comercialmente) así como con ratones de la cepa NOD por lo que fue posible disponer de material biológico procesado en el laboratorio de la FCEyN bajo las normas del Comité de Ética Animal institucional para utilizar en los ensayos *in vitro* realizados en el marco de esta tesis.

El perfil serológico de autoanticuerpos y las manifestaciones clínicas de la EC: vínculo con la presencia de complicaciones gineco-obstétricas

En este capítulo se describe en primera instancia el planteo inicial del trabajo centrado en evaluar si las diversas manifestaciones clínicas de la EC se correlacionan con el perfil de autoanticuerpos presentes en el suero de los pacientes. En función de los resultados se profundizó en el estudio de algunas propiedades funcionales de los autoanticuerpos específicos contra la transglutaminasa tisular en ensayos *in vitro* y se analizó la correlación con las manifestaciones clínicas. La mayor parte de estos resultados están contenidos en la publicación adjunta (Art. 1):

“Celiac disease and gynecologic complications: can serum antibodies modulate tissue transglutaminase functions and contribute to clinical pattern?”

Sóñora C, Munoz F, Del Rio N, Acosta G, Montenegro C, Trucco E, Hernández A.
Am J Reprod Immunol 2011;66:476-487.

Se describen a continuación los principales resultados y sus implicancias.

En base a los antecedentes expuestos en la introducción general son varios los trabajos que plantean un rol de los autoanticuerpos en la patogenia (Caputo, Barone et al. 2009; Lindfors, Kaukinen et al. 2009) sin embargo es aún un tema controvertido. Nosotros consideramos que es posible que la reactividad serológica individual frente a diversos epítopes de la tTG (especificidad fina), el isotipo de los anticuerpos, y la presencia de otros autoanticuerpos en forma concomitante podrían explicar en parte la heterogeneidad de las presentaciones clínicas.

En este contexto realizamos un análisis del perfil de reactividad serológica en relación a las manifestaciones clínicas sobre un panel de sueros derivados de 50 pacientes celíacos con diagnóstico confirmado reciente (rango de edad 18-60 años; mediana 35 años). El grupo estaba integrado por pacientes asintomáticas en las que el diagnóstico fue casual, pacientes con presentación clásica de la EC con sintomatología digestiva exclusivamente y una mayoría de pacientes polisintomáticas según se esquematiza en la Figura 7.

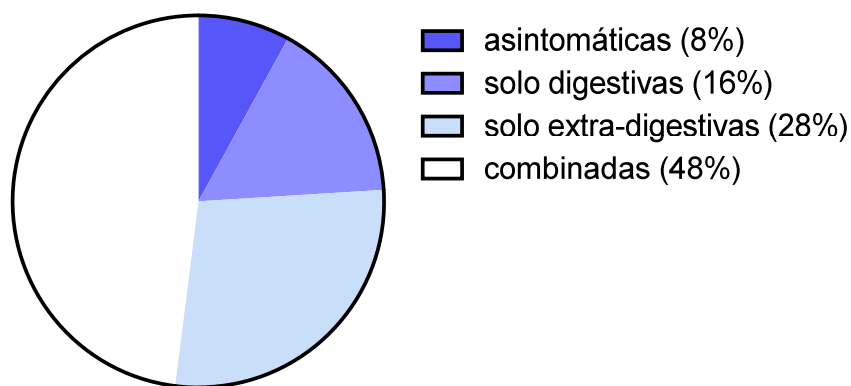


Figura 7. *Distribución de las manifestaciones clínicas de las pacientes celíacas del grupo de estudio (n=50)*

Las manifestaciones sistémicas más frecuentemente observadas fueron la anemia (27/50) seguida de la ocurrencia de problemas obstétricos y/o ginecológicos (21/50) e hipotiroidismo (10/50). La Figura 8 muestra la frecuencia de cada trastorno e indica que las presentaciones polisintomáticas fueron predominantes para todas las manifestaciones.

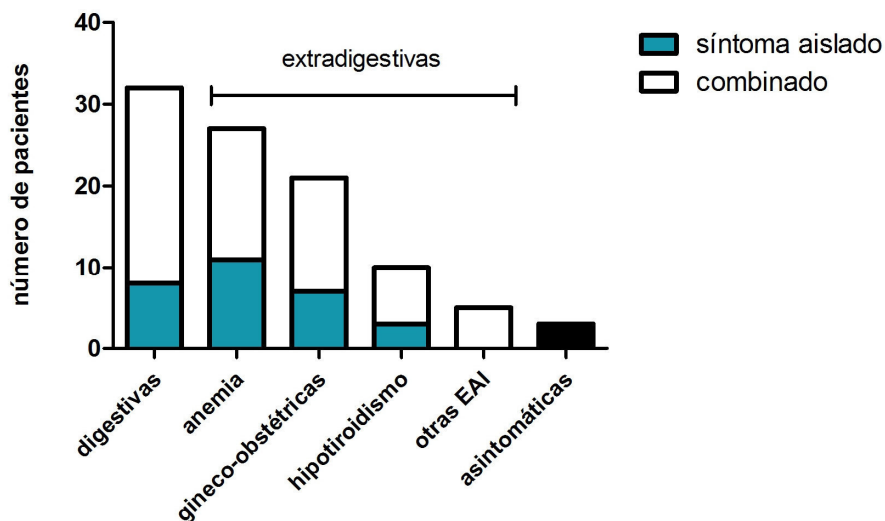


Figura 8. Frecuencia de manifestaciones clínicas en el grupo de pacientes estudiadas.

La distribución individual de síntomas en el grupo de estudio se describe en la Tabla 3 y la Tabla I (Art. 1).

La anemia es un síntoma clásicamente vinculado a la EC, que frecuentemente se asocia a problemas carenciales aunque no es posible descartar otra etiología (Halfdanarson, Litzow et al. 2007; Harper, Holleran et al. 2007). Resultó llamativo el elevado número de mujeres que reportaban antecedentes de algún tipo de desorden obstétrico y/o ginecológico durante la edad reproductiva.

El alto número de pacientes con hipotiroidismo es un hallazgo coherente con los datos que muestran una prevalencia aumentada de EC en pacientes que presentan enfermedades autoinmunes de la tiroides (Collin, Salmi et al. 1994).

Otra patología asociada clásicamente con la EC es la diabetes mellitus tipo I (Holmes 2001), en nuestro estudio encontramos 2 pacientes con dicha patología las que además presentaban hipotiroidismo y desórdenes gineco-obstétricos.

Las otras patologías autoinmunes presentes en nuestro grupo de estudio fueron vitiligo (2 casos) y polimiositis (1 caso).

El espectro de desórdenes y su frecuencia relativa se describen en la Tabla II (Art. 1).

2.1 Análisis de los perfiles de reactividad serológica.

Para analizar los patrones serológicos de nuestro grupo de estudio se realizaron las determinaciones de acuerdo a los kits comerciales utilizados o el método estandarizado en el laboratorio tal como se describe en la publicación anexa.

En primera instancia evaluamos el perfil de isotipos de contra tTG presentes en las muestras encontrando que todas presentaron IgA específica (determinada tanto mediante un kit comercial de ELISA con tTG humana purificada como por un ensayo de ELISA estandarizado en el laboratorio utilizando tTG de cobayo); solamente 13 pacientes (26%) presentaron además IgG específicas (pacientes 2-14; Tabla 3).

Además, se analizó la presencia de anticuerpos IgA y/o IgG específicos contra péptidos deamidados de gliadina (DGP) mediante *Quanta Lite™ Celiac DGP Screen* y anticuerpos específicos contra Actina con *Quanta Lite™ Actin IgG ELISA*, ya que estos anticuerpos fueron considerados por algunos autores como indicadores del grado de la lesión intestinal y eventualmente de sintomatología digestiva (Alaedini and Green 2008; Tonutti and Bizzaro 2014).

La peroxidasa tiroidea (TPO) y cardiolipina fueron seleccionados como autoantígenos eventualmente implicados en la patología en base a otras enfermedades autoinmunes asociadas como es el caso del hipotiroidismo autoinmune o síndromes que podrían ser causa de algunas de las manifestaciones observadas como el síndrome antifosfolípido.

La información resultante del análisis serológico inicial fue expresada en valores discretos (positivo/negativo) para la presencia de cada condición clínica de acuerdo al umbral establecido para cada kit utilizado (Tabla 3). De esta forma se analizó mediante el test de Chi-cuadrado ó la prueba exacta de Fisher la asociación entre variables cualitativas (manifestación clínica vs autoanticuerpo).

La presencia de sintomatología digestiva, en forma aislada ó concomitante con alguna otra manifestación sistémica, se correlacionó con un espectro más amplio de especificidades de los anticuerpos (Tabla 4).

Sin embargo, la presentación atípica de la EC no se correlacionó con mayor frecuencia de otros autoanticuerpos, así como tampoco fue posible correlacionar la presencia de cada una de las manifestaciones mayoritarias (anemia, gineco-obstétrica, disfunción tiroidea) con un perfil serológico particular (Tabla 4).

Tabla 3. Relación entre manifestaciones clínicas y presencia de anticuerpos.

	Manifestaciones clínicas			Serología específica EC			Otros autoanticuerpos		
	solo D ó AS	solo ED	D + ED	tTG IgA	IgG	DGP IgG/IgA	Actina IgG	Cardiolipina IgG/IgM	TPO IgG
1	-	+	-	+	-	+	+	-	+
2	-	-	+	+	+	-	+	-	-
3	-	-	+	+	+	+	+	-	-
4	-	-	+	+	+	+	+	+	-
5	-	-	+	+	+	+	+	-	-
6	+	-	-	+	+	+	-	-	-
7	-	-	+	+	+	+	+	-	-
8	-	+	-	+	+	+	-	-	-
9	+	-	-	+	+	+	+	-	-
10	+	-	-	+	+	+	+	-	+
11	+	-	-	+	+	+	-	-	-
12	-	+	-	+	+	+	-	-	-
13	+	-	-	+	+	+	-	-	-
14	+	-	-	+	+	+	+	-	-
15	-	-	+	+	-	+	-	-	-
16	-	-	+	+	-	-	+	-	-
17	-	-	+	+	-	-	+	+	-
18	-	+	-	+	-	-	-	-	-
19	-	-	+	+	-	+	-	-	-
20	+	-	-	+	-	-	-	-	+
21	-	+	-	+	-	+	-	-	-
22	-	-	+	+	-	-	+	-	-
23	-	-	+	+	-	+	-	-	-
24	-	-	+	+	-	+	+	+	-
25	-	+	-	+	-	+	+	+	-
26	-	-	+	+	-	+	+	-	+
27	+	-	-	+	-	+	+	-	+
28	-	-	+	+	-	-	+	-	-
29	-	-	+	+	-	+	+	-	-
30	-	-	+	+	-	+	+	-	-
31	-	+	-	+	-	+	+	+	+
32	-	-	+	+	-	-	+	-	-
33	-	-	+	+	-	+	+	+	-
34	-	+	-	+	-	+	-	-	-
35	-	+	-	+	-	+	-	+	-
36	-	-	+	+	-	-	-	-	-
37	+	-	-	+	-	+	-	-	+
38	-	+	-	+	-	+	+	-	-
39	-	-	+	+	-	+	-	-	-
40	-	-	+	+	-	-	+	-	+
41	-	-	+	+	-	+	-	+	-
42	-	+	-	+	-	+	+	-	-
43	-	+	-	+	-	+	-	+	-
44	-	+	-	+	-	+	-	-	-
45	-	-	+	+	-	+	+	+	-
46	-	-	+	+	-	-	+	+	-
47	+	-	-	+	-	+	-	-	-
48	+	-	-	+	-	+	-	-	-
49	+	-	-	+	-	-	-	-	-
50	-	+	-	+	-	+	+	-	-

AS: asintomáticas D: manifestaciones digestivas

ED: manifestaciones extradigestivas

Tabla 4. Estudio de asociación entre manifestaciones clínicas y los autoanticuerpos.

Manifestaciones	Serología específica EC			Otros autoanticuerpos		
	tTG IgA	tTG IgG	DGP	Actina	Cardiolipina	TPO
solo D		(2)		(2)	(1)	
D + ED			(1)	(1)		
solo ED						

D: manifestaciones digestivas ED: manifestaciones extradigestivas

(1) $P < 0.05$ Chi square test ó prueba exacta de Fisher (2) tendencia, $P = 0.08$

La siguiente aproximación consistió en evaluar si los anticuerpos presentes contra la tTG en la totalidad de los pacientes mostraban alguna diferencia cualitativa desde el punto de vista funcional, que podría ser reflejo de especificidades finas diferentes. Como se mencionó en la introducción la tTG es una proteína multifuncional, con varios dominios implicados en sus funciones catalíticas y adhesivas.

2.2 Reactividad serológica contra tTG y tTG unida a FN.

En trabajos previos se ha verificado que la tTG posee varios epítopes potenciales que pueden ser reconocidos por los anticuerpos generados por los pacientes celíacos (Marzari, Sblattero et al. 2001; Seissler, Wohlrab et al. 2001; Sblattero, Florian et al. 2002; Simon-Vecsei, Kiraly et al. 2012) pero aún no existen estudios acerca de la correlación entre los patrones de reactividad serológica y las manifestaciones clínicas de la EC.

Por lo que analizamos si la reactividad de los IgA contra tTG podría verse afectada si la conformación de la enzima cambiaba debido a su interacción con FN.

Esta estrategia experimental fue validada previamente analizando el comportamiento de tres AcMo específicos contra diferentes regiones de la tTG en el trabajo perteneciente a la tesina de la Lic. Florencia Muñoz "Estudio de la Transglutaminasa tisular extracelular como blanco de los autoanticuerpos en la Enfermedad Celíaca" del año 2009.

Los resultados mostraron que en la mayor parte de los sueros la reactividad disminuía más del 30 % cuando la enzima se encontraba unida a FN (Figura 1b, Art.1) respecto a su interacción con la conformación abierta en presencia de calcio, sin embargo no se encontró correlación significativa entre estos datos y las manifestaciones clínicas que presentaron las pacientes.

2.3 Efectos de los sueros en la actividad de transamidación de la tTG.

En el marco de esta tesis exploramos los efectos de los sueros en la actividad de transamidación de la tTG y su posible vinculación con la sintomatología.

Con este fin se estandarizó un ensayo en microplaca en el cuál se determina la incorporación de aminos biotiniladas a la FN con la cuál se sensibiliza la placa, como reacción de transamidación catalizada por la tTG de cobayo.

Contrariamente a lo observado con los sueros control, cuando la enzima fue preincubada con algunos de los sueros con anticuerpos anti-tTG (dilución 1:100) antes de agregar el sustrato, la incorporación de la amina biotinilada a la FN se vio inhibida demostrando la habilidad de los autoanticuerpos de alterar la actividad de la tTG.

Se evaluó en paralelo el efecto del inhibidor competitivo monodansyl cadaverina sobre la actividad de la tTG, el cual provocó una disminución promedio del 50 % de dicha actividad en relación a la condición basal.

Los resultados observados con los sueros de las pacientes fueron variados; 16 de los 50 sueros analizados inhibieron la actividad enzimática al menos en un 30 % mientras que 2 de ellos indujeron un incremento de ésta en relación a la condición basal.

Interesantemente, la mayoría de los sueros que disminuyeron la actividad enzimática pertenecían al grupo de mujeres con antecedentes de problemas gineco-obstétricos (11/21) observándose una correlación estadísticamente significativa entre la presencia de estas manifestaciones clínicas y los resultados del ensayo *in vitro* mediante un test de asociación de variables cualitativas (Tabla I, Art.1). Además, se evidenció una diferencia estadísticamente significativa entre los valores de actividad enzimática relativa obtenidos en presencia de los sueros de las pacientes con estos trastornos y los obtenidos con los provenientes de las donantes sanas o pacientes celíacas sin síntomas extra-digestivos.

Dentro de las pacientes con alteraciones gineco-obstétricas los sueros que mostraron los mayores valores de inhibición de la actividad enzimática fueron los provenientes de mujeres con historia de abortos y alteraciones ginecológicas (Figura 2, Art. 1).

Dado que la presencia de otros autoanticuerpos se ha asociado con ocurrencia de abortos y otros problemas del embarazo relacionados (Hill 1990; Ogasawara, Aoki et al. 1999) investigamos la presencia de anticuerpos anticardiolipina IgG e IgM en los sueros de las pacientes con trastornos gineco-obstétricos encontrando su presencia en 5/21 (4 con IgM y sólo uno con IgG) por lo que no se puede descartar la implicancia de estos autoanticuerpos en la ocurrencia de estos trastornos en estas 5 pacientes.

2.4 Reactividad de los sueros con tejidos placentarios.

Para avanzar sobre la hipótesis planteada del posible rol de los anticuerpos anti-tTG y los trastornos obstétricos, nos propusimos evaluar la potencialidad de los autoanticuerpos de reconocer a la tTG expresada en la placenta. Como primera aproximación utilizamos cortes de placenta humana normal a término como tejido representativo de la interfase materno-fetal en el cuál la tTG se expresa en forma importante y dónde podría ser blanco de los autoanticuerpos maternos circulantes.

Se observó una señal intensa a nivel de las microvellosidades de membrana del sinciotrofoblasto y de los elementos vasculares con el AcMo 4E1 específico contra tTG coincidiendo con lo reportado previamente (Hager, Gliemann et al. 1997; Robinson, Glazier et al. 2006) (Figura 3c, Art.1).

Este AcMo se une a un epítipo localizado en la región del barril 2 del extremo carboxilo terminal de la enzima (aa 637-648)(Di Niro, Ferrara et al. 2005).

Con los sueros procedentes de mujeres con problemas gineco-obstétricos se obtuvo un marcado a nivel del sinciotrofoblasto (Figuras 3a y 3b, Art.1) con un patrón similar al obtenido con el AcMo 4E1 y al descrito previamente en otros trabajos (Anjum, Baker et al. 2009).

2.5 Reactividad de los sueros con tejidos tiroideos.

La disfunción tiroidea es una alteración muy común en mujeres con EC (Sategna-Guidetti, Volta et al. 2001) y en nuestro grupo de estudio se observó en 10 de las 50 pacientes constituyendo el tercer desorden extra-digestivo más común (Tablas I y II, Art.1).

De las 10 pacientes con dato clínico de hipotiroidismo solo una tenía anticuerpos antitiroideos (anti-TPO) detectados por técnicas de ELISA comerciales mientras que 7 pacientes que no reportaban diagnóstico clínico de hipotiroidismo presentaron dichos anticuerpos (Tabla 3).

La expresión de la tTG en el tejido tiroideo se ha reportado a nivel de las células epiteliales y también en la MEC de las áreas interfoliculares (Naiyer, Shah et al. 2008), por lo que se puede pensar que la presencia de anticuerpos anti-tTG podría contribuir a la disfunción tiroidea.

Mediante técnica de inmunofluorescencia indirecta, revelada con un anti-IgA conjugado con FITC, enfrentamos los sueros de pacientes celíacas, sin anticuerpos anti-TPO, con improntas comerciales con cortes de tiroides de simio. Interesantemente, encontramos patrones de marcado que sugieren un reconocimiento específico de la tTG en 2 pacientes con síntomas y 8 sin síntomas de hipotiroidismo (al momento del diagnóstico de la EC). En estos

casos la señal fluorescente fue detectada a nivel de las células epiteliales foliculares y a nivel de la MEC de los espacios interfoliculares (Figura 4d, Art.1), este patrón es comparable al observado con el AcMo CUB7402 (NeoMarkers, Denmark) (Figura 4c, Art.1) y diferente del típico marcado debido a la presencia de anti-TPO (Figura 4a, Art. 1) y además es consistente con el reportado en trabajos previos donde se estudia la expresión de tTG en tejidos tiroideos (Naiyer, Shah et al. 2008).

En resumen, en esta parte del trabajo analizamos la correlación existente, en un grupo de estudio constituido por 50 mujeres celíacas, entre la presencia de las diferentes manifestaciones clínicas con el efecto *in vitro* de los sueros sobre la actividad catalítica de entrecruzamiento de la enzima y con la reactividad de los mismos contra la tTG unida a FN.

De los resultados se destaca el hecho de que en este grupo una gran proporción de las pacientes reportó alteraciones del área gineco-obstétrica y que se observó una correlación estadísticamente significativa entre la presencia de las mismas y la afectación de la actividad enzimática de la tTG en un ensayo *in vitro* en presencia de suero de las mujeres celíacas lo que permite apoyar la hipótesis de que los autoanticuerpos no son un mero epifenómeno en la EC.

A partir de estos resultados orientamos el trabajo hacia la búsqueda de una relación causa efecto entre la presencia de los anticuerpos y las manifestaciones gineco obstétricas, mediante la interferencia de los anticuerpos con los diversos procesos biológicos en los que la tTG extracelular está implicada.

El desarrollo de esta nueva etapa propició el vínculo colaborativo con las Dras. Claudia Perez-Leirós y Rosanna Ramhorst, quienes llevan adelante sus investigaciones en el área de la Inmunología de la Reproducción en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UBA. Esta colaboración fue central para abordar el estudio de los posibles mecanismos involucrados en las alteraciones gineco-obstétricas y en particular en el estudio de los aspectos moleculares de la implantación embrionaria y el rol del sistema inmune en este proceso.

Artículo 1

Los anticuerpos anti-Transglutaminasa tisular y su relación con los problemas reproductivos asociados a la Enfermedad Celíaca 52

Celiac Disease and Gyneco-obstetrics Complications: Can Serum Antibodies Modulate Tissue Transglutaminase Functions and Contribute to Clinical Pattern?

Cecilia Sónora¹, Florencia Muñoz¹, Natalia Del Río¹, Gisèle Acosta², Cecilia Montenegro³, Elena Trucco⁴, Ana Hernández¹

¹Cátedra de Inmunología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay;

²Depto de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay;

³Depto de Patología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay;

⁴Servicio de Gastroenterología y Endoscopia digestiva, Hospital Maciel, Montevideo, Uruguay

Keywords

Autoimmunity, celiac disease and reproductive disorders, tissue transglutaminase

Correspondence

Ana Hernández, Cátedra de Inmunología, Instituto de Higiene, Alfredo Navarro 3051, Montevideo, Uruguay.
E-mail: aherna@fq.edu.uy

Submitted February 22, 2011;
accepted April 5, 2011.

Citation

Sónora C, Muñoz F, Del Río N, Acosta G, Montenegro C, Trucco E, Hernández A. Celiac disease and gyneco-obstetrics complications: can serum antibodies modulate tissue transglutaminase functions and contribute to clinical pattern? *Am J Reprod Immunol* 2011

doi:10.1111/j.1600-0897.2011.01020.x

Problem

Untreated celiac disease (CD) is often associated with early miscarriages, infertility, and alterations in menstrual cycle. Tissue transglutaminase (tTG) antibodies could be involved by interfering with tTG transamidating activity and/or biological functions mediated by its interaction with fibronectin (FN).

Method of study

The correlation between the presence of extra-digestive disorders and the reactivity of sera against tTG-FN and its effects on tTG transamidating activity was analyzed in a group of 50 women with recently diagnosed CD.

Results

Heterogeneous behavior was observed among serum samples derived from patients with different complaints, suggesting that differences in fine specificity patterns could condition clinical outcome. Sera from women with gynecological and/or obstetric problems induced significant inhibition of *in vitro* enzymatic activity in comparison with those without these kinds of disorders.

Conclusions

The significant correlation observed between serum effects and clinical profile suggests a putative involvement of tTG-specific antibodies in gynecological and/or obstetric disorders during active CD.

Introduction

Celiac disease (CD), or gluten-sensitive enteropathy, is a multifactorial disease with an incidence reaching 1% in Western countries and North America^{1,2} with increasing prevalence worldwide.³ The clinical picture of celiac disease (CD) varies greatly; classically

the disease is associated with gastrointestinal symptoms such as abdominal pain, diarrhea or constipation, frequently accompanied by weight loss, bone disease, anemia and weakness.⁴

Silent and atypical presentations of the disease are increasingly found in which gastrointestinal symptoms are less pronounced or absent; instead,

extra-intestinal features, such as anemia, osteoporosis, dermatologic or neurologic problems are more prominent;^{5–8} particularly, women appear to be preferentially affected⁹ and implications on menstrual and reproductive health have been extensively reported.^{10,11} Late menarche (onset at 16 years or later) and early menopause (onset before 45 years)¹² have both been associated with CD;^{13,14} in relation with reproductive disorders,¹⁵ complications in conception and pregnancy have been reported in untreated celiac women, mainly recurrent early miscarriages,¹⁶ premature and low birth weight babies.¹⁷

In addition, CD has been associated with other autoimmune conditions, such as insulin-dependent diabetes mellitus, Hashimoto's thyroiditis, Graves and Addison's diseases.¹⁸

Autoimmunity has been recognized as a feature of CD because tissue transglutaminase (tTG; EC 2.3.2.13) was identified as the main autoantigen,¹⁹ and detection of antibodies against tTG is widely used as a diagnostic indicator for CD.²⁰

Tissue transglutaminase is a multifunctional enzyme that is widely expressed in most tissues at every cellular compartments;²¹ it controls cell and tissue homeostasis through its involvement in proliferation, terminal differentiation, and apoptosis.

Several biological functions of tTG such as the stabilization of the extracellular matrix and tissue repair are mediated by the transamidation activity (an acyl-transfer reaction between the γ -carboxamide group of peptide-bound glutamine and the ϵ -amino group of peptide-bound lysine) that results in cross-linking of various substrate proteins.²² The interaction of tTG with fibronectin (FN) has a high affinity, and the enzyme is involved in its assembly.²³ In addition, at the cell surface, the enzyme acts as a β 1, β 3 integrin coreceptor for FN, a function that is important in cell adhesion and migration.²⁴ Besides, surface tTG appears to be involved in the clearance of apoptotic cells by promoting efficient signaling in the phagocytic cell, acting as a β 3 integrin coreceptor in macrophages.²⁵

The involvement of tTG in physiology of female reproductive tract has been suggested, during normal menstrual cycle and reproductive-associated events.^{26–28} Thus, it is possible that tTG dysfunction could contribute to these kinds of disorders in women.

In extracellular compartments, tTG is recognized by autoantibodies in celiac patients; deposition of IgA-specific antibodies against tTG closely related to

the FN network has been localized in jejunum specimens;²⁹ the colocalizations of IgA antibodies in other organs such as the liver, muscle, brain, and heart indicate that tTG is widely accessible to circulating antibodies.^{29,30}

Inhibition of tTG function by specific antibodies has been reported in different *in vitro* assays, arguing that anti-tTG antibodies could be involved in pathogenesis; it has been proven that tTG-specific antibodies can affect enzyme activity,^{31,32} endothelial permeability,³³ angiogenesis,³⁴ cell differentiation, and proliferation.³⁵

The autoantibody response of celiac patients is heterogeneous; IgA antibodies are produced against distinct functional regions of tTG molecules, and most patients exhibit autoantibodies directed to more than one epitope.^{36,37}

Thus, the individual repertoire of fine specificity of tTG antibodies could condition the clinical picture of the disease, contributing to the onset of different extra-digestive symptoms.

With the aim to gain insight into the role of tTG autoantibodies in extra-digestive pathogenesis, we analyzed the correlation of symptoms with the *in vitro* effect of serum on catalytic activity and with its reactivity with FN-linked tTG. Results are mainly discussed in relation to gynaecological and obstetric problems, which represent symptoms that are frequently associated with atypical presentations of celiac disease women.

Materials and methods

Study Group

Serum samples were obtained from 50 women with recently diagnosed untreated celiac disease (age range: 18–60, mean: 36 years) who were clinically evaluated at local hospitals, mainly Hospital Maciel; some patients were recruited from the Uruguayan Celiac Association. All patients had small bowel biopsy-proven CD. Serum samples from patients and from healthy blood donors ($n = 11$) were stored at -20°C until use.

Clinical data are summarized in Table I, 32 of 50 celiac patients had gastrointestinal manifestations and 31 of 50 were polysymptomatic with at least two disorders reported at CD diagnosis. The most common extra-digestive complaint presented in this study group was anemia (27/50) followed by history of gynecological and/or obstetric problems

Table I Clinical and experimental data

Patient no.	Clinical data ^a				Experimental data	
	Extradigestive disorders				Assays	
	Digestive symptoms	Anemia	Gynec/obstetric	Hypothyroidism	tTG-FN ELISA ^b	tTG activity ^c
1	—	+	+	—	—	—
2	+	—	—	+	+	—
3	+	+	+	+	+	—
4	+	+	—	—	+	—
5	+	+	+	—	—	—
6	—	—	—	—	+	—
7	+	—	+	—	+	+
8	—	+	+	+	+	+
9	+	—	—	—	+	—
10	+	—	—	—	+	—
11	+	—	—	—	+	—
12	—	—	—	+	+	—
13	—	—	—	—	+	+
14	+	—	—	—	+	—
15	+	+	—	—	—	—
16	+	+	+	—	—	+
17	+	—	+	—	—	—
18	—	+	+	—	+	+
19	+	—	+	—	+	+
20	+	—	—	—	+	—
21	—	+	—	—	—	+
22	+	+	+	—	—	—
23	+	+	+	—	+	+
24	+	+	+	—	—	+
25	—	+	+	+	+	—
26	+	—	+	—	—	+
27	+	—	—	—	+	—
28	+	+	—	—	—	—
29	+	+	+	—	+	—
30	+	+	—	—	+	—
31	—	+	—	—	+	—
32	+	—	+	—	—	+
33	+	+	—	+	+	+
34	—	—	+	+	+	—
35	—	+	—	+	—	—
36	+	+	+	—	+	+
37	+	—	—	—	+	—
38	—	+	—	—	+	—
39	+	+	+	—	+	—
40	+	+	—	+	+	—
41	+	—	+	—	+	+
42	—	+	—	—	+	+
43	—	+	—	—	—	—
44	—	+	—	—	+	—
45	+	+	—	—	+	—
46	+	—	+	—	—	—
47	+	—	—	—	+	—

Table I Continued

Patient no.	Clinical data ^a				Experimental data	
	Extradigestive disorders				Assays	
	Digestive symptoms	Anemia	Gynec/obstetric	Hypothyroidism	tTG-FN ELISA ^b	tTG activity ^c
48	—	—	—	—	+	—
49	—	—	—	—	—	—
50	—	—	—	+	+	+
32/50		27/50	21/50	10/50		

Clinical data and results obtained in the assays are indicated for each celiac patient that integrates the study group.

^a+/- indicates the presence/absence of the type of symptom or disorder described in each column. Gynecological /obstetric disorders include alterations of menstrual cycle, conception, pregnancy, and breastfeeding.

^b+/- indicates if recognition of tissue transglutaminase (tTG) by serum IgA antibodies is (+) or is not (-) decreased more than 30%, when the enzyme is bound to fibronectin (FN).

^c+/- indicates that the tTG transamidating activity is (+) or is not (-) affected by the presence of serum, according to the cutoff defined with control sera.

(21/50) and hypothyroidism (10/50); in addition, two patients (No. 26 and 37) had type 1 diabetes mellitus. Further description of the group of patients that reported extra-digestive disorders is shown in Table II. Patient serum samples were used with permission from the Ethical Committee of the Faculty of Medicine, University of the Republic, Uruguay, and the informed consent of each participant was obtained for use of serum samples.

Determination of autoantibodies in sera from patients

Levels of tTG-specific IgA and IgG antibodies were determined by enzyme-linked immunosorbent assay using Quanta Lite™ h-tTG IgA and Quanta Lite™ h-tTG IgG ELISA. IgG and IgM anticardiolipin titers were measured using Quanta Lite™ ACA IgG III and ACA IgM III ELISA. Anti-thyroperoxidase (TPO) antibody titers were screened with Quanta Lite™ TPO ELISA. In all cases, we proceeded according to the manufacturer's instructions (INOVA Diagnostics, Inc., San Diego, CA, USA).

Table II Antecedents of extra-digestive disorders associated with celiac disease in the study group

	Nro.
Gynecological and obstetric disorders ^a	
Late menarche (16,17,19 years)	3
Spontaneous early menopause (38, 42 years)	2
Sterility	3
Early miscarriages	7
Premature babies	2
Short breastfeeding	4
Others	
Anemia	
As a single extra-digestive disorder	11
Associated with other extra-digestive symptom	16
Hypothyroidism	
As a single extra-digestive disorder	2
Associated with other extra-digestive symptom	8
Autoimmune disorders	
Polymyositis	1
Type 1 Diabetes	2
Vitiligo	2

^aClinical history of gynecological and/or obstetric problems and anemia were reported as the most significant disorder associated with celiac disease; all women of this group had at least another extra-digestive symptom, being anemia (12/21) and hypothyroidism (4/21) the most frequently found.

Comparison of the Reactivity of Sera Against tTG and Fibronectin-Bound tTG (FN-tTG)

A modified assay (FN-tTG ELISA) was used to compare the reactivity of each serum against guinea pig tTG with its reactivity against tTG-bound to fibronectin (FN), according to the method described by Teesalu et al.,³⁸ with modifications. In parallel, titers against human FN were also determined in serum samples. Briefly, for standard assay, 96-well microtitre plates (Greiner, Germany) were incubated with 1 µg of tTG per well in 100 µL TBS-Ca buffer (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7.4) overnight at 4°C. For the modified assay, some wells were previously coated with 1 µg purified plas-matic human FN in 100 µL of TBS buffer, pH = 10, overnight at 4°C before incubating with tTG.

Then, the plates were blocked with 200 µL/well of bovine serum albumin (BSA) in PBS 1% for 1 h at room temperature and then washed three times with PBS-Tween 20 (0.05%).

Serum samples from patients or healthy donors were diluted 1:100 in PBS-Tween 20 (0.05%)-BSA 1%, and incubated in duplicate on tTG, tTG-FN, and

FN-coated wells for 1 h at room temperature. After washings, the wells were incubated with dilutions of horseradish peroxidase-conjugated goat anti-human IgA antibodies for 60 min at room temperature. After washings, the color reaction was developed with H₂O₂-containing substrate solution of 0.1 mg/mL tetramethylbenzidina (TMB). Optical densities (OD) were read at 450 nm after stopping the reaction with H₂SO₄ 1N. All reagents were purchased from Sigma, St Louis, MO, USA, unless otherwise indicated.

To compare the reactivity of each serum against tTG and FN-tTG, the variation between OD registered against tTG and FN-tTG was expressed as relative OD (%) defined as $OD_{FN-tTG} \times 100 / OD_{tTG}$.

A previous assay was performed using mouse IgG monoclonal antibodies that recognize different lineal epitopes of the tTG.³⁹ 4E1 and 2G3 recognize domains of the tTG located at aa 637–648 and aa 314–329, respectively (kindly provided by F. Chirido), and commercial CUB 7402 (Neomarker, USA) is directed to a core domain (aa 447–478).

Competition assay was also performed in parallel with the same representative sera to verify if the FN-binding site of the tTG molecule contains epitopes recognized by autoantibodies in sera; assays were carried out using 96-well microtitre plates (Greiner, Germany) coated with tTG as previously described, and 1:100 diluted serum samples were incubated in parallel with a solution of FN (5 µg/well) as competitor and buffer. After washing, the ELISA was completed as described earlier. The OD signal of the serum without competitor was defined as 0% inhibition.

Transamidating Activity Assay of tTG

The measure of transamidating activity of guinea tTG is based on the cross-linking of 5-(biotinamido)-pentylamine into immobilized human FN as previously described,³¹ with some modifications. Briefly, each well of a microtiter plate (Greiner, Germany) was coated with 100 µL of a solution of 1 µg/mL human FN in TBS buffer pH 10 overnight at 4°C. After washing with TBS-Tween 20 (0.05%), the wells were coated with tTG in TBS buffer (20 mM TrisHCl, pH 7.2, 150 mM NaCl) containing 5 mM CaCl₂ and 10 mM DTT for 30 min at 37°C. Then, 200 µL of 1 mM 5-(biotinamido)-pentylamine substrate (Pierce, USA) in a TBS buffer containing 8 mM CaCl₂, pH 8.5, was added to each well and incubated for 1 h at 37°C.

The amine incorporation was detected with peroxidase-conjugated streptavidin followed and TMB substrate solution as described above.

To evaluate the effect of serum on transglutaminase activity of tTG, the amine substrate was added after incubating the serum samples from celiac patients or healthy individuals (1:100) for 20 min at 37°C and washings.

Each assay was performed in parallel with the competitive specific inhibitor monodansyl cadaverine at 250 μ M. Assays with sera from healthy donors were included and media plus two standard deviations were considered as a cutoff to define significant variation. tTG activity is indicated as relative activity, expressed as a percentage of the basal activity obtained without the addition of serum, activity (%) = $OD_{\text{serum}} \times 100 / OD_{\text{basal}}$. Assays were performed in duplicate and the media for each individual is indicated.

Immunostaining of Placental Tissue Sections

Sections of normal term placenta were dewaxed and rehydrated and boiled during 20 min in 10 mM sodium citrate, pH 6.0. Sections were pretreated with normal goat serum and then incubated overnight at 4°C, with serum samples from celiac women with history of gynecological/obstetric problems or healthy donors (dil. 1:50 in PBS-BSA 1%); 4E1MoAb (1:100) was used in parallel as a control. After three washes with PBS, quenching of endogenous peroxidase activity was performed with 3% H_2O_2 in PBS for 20 min. Sections were then incubated for 1 hr at room temperature with either goat anti-human IgA-horseperoxidase or goat anti-mouse immunoglobulin-horseperoxidase (1:100). The reaction was developed with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride 10 mg/mL in TBS with 0.03% H_2O_2 for 15 min; slides were counterstained with Mayer's hematoxylin and mounted. For every assay, negative controls without primary antibody were included.

Immunostaining of Thyroid Tissue Sections

Serum samples from celiac women, control sera, and reference antibody CUB 7402 (0.01 μ g/ μ L) were incubated with primate thyroid slides (MT-Fluoro Kit™; DiaSorin, Stillwater, MN, USA) for 60 min at room temperature. After several washes with PBS, sections were incubated for 60 min with appropriate dilutions of fluorescein isothiocyanate-

conjugated goat anti-human IgA or anti-mouse IgG accordingly to the sample.

A TPO-specific serum was used for reference staining. Both anti-tTG-positive and anti-tTG-negative sera were included in each batch of tests. The slides were analyzed using a fluorescence microscope.

All reagents were purchased from Sigma, St Louis, MO, USA, unless otherwise indicated.

Statistics

The Pearson Chi-square test was used to analyze the correlation of discrete data and Mann-Whitney test was applied to compare continuous data from different groups. Significance was determined at $P < 0.05$.

Results

Serological Reactivity Against tTG and FN-tTG

Previous reports have verified through different complementary approaches that the tTG has several potential epitopes located throughout the whole molecule, which can be recognized by antibodies generated by celiac patients,^{36,40,41} but no correlation is available concerning the correlation between serological patterns of reactivity and clinical outcome.

To analyze qualitative serological patterns in our study group, we first evaluated isotype profiles; all patients were positive for tTG-specific IgA antibodies, determined by either a commercial kit using human purified tTG or a standard home made ELISA using guinea tTG; only 13 patients (26%) presented IgG-specific antibodies (Table I, patients 1–13). Optical densities obtained in ELISA assays were compared with those obtained with sera obtained from healthy donors ($n = 11$), which exhibited irrelevant reactivity against gptTG and were negative in the commercial ELISA for IgA and IgG.

Then we analyzed if the reactivity of IgA antibodies against tTG would be modified when the enzyme conformation changed because of its interaction with FN, a main component of the extracellular matrix. To this aim, both a standard ELISA to detect tTG-specific IgA and a modified tTG-FN assay were run in parallel to decipher if reactivity against the interaction zone between both proteins could be involved in an immune reaction, thus indicating a putative target for autoantibodies that could affect biological

cell functions such as migration and adhesion to an extracellular matrix.

To validate this experimental approach, we first analyzed the behavior of three monoclonal antibodies that are specific to different regions of tTG,³⁹ to evaluate whether the assay revealed specificity differences. Results show that the reactivity of CUB 7402, which recognizes aa447–478 located in the core of the protein, is poorly modified when tTG interacts with FN; in contrast, the reactivity of MoAb 2G3 and 1H7 that are directed to distant zones of the central regions (aa637–648 and aa314–329), respectively, decreased when tTG was bound to FN on the plate (Fig. 1a).

The interassay variation coefficient for relative OD (%) was determined in three independent assays with CUB 7402, and this result (30%) was used for analysis purpose to compare the reactivity of sera from patients.

When we evaluated the serological reactivity of celiac patients who participated in the study group, a heterogeneous pattern of reactivity was observed among patients; results show that most sera (35/50) decreased their reactivity by more than 30% when tTG interacts with FN, 13 showed minor changes and the reactivity of two sera unexpectedly increased (Fig. 1b). No significant correlation was achieved when analysis was performed according to clinical data; nevertheless, a tendency was observed indicating that the group of sera from patients with history of gynecological/obstetric complains had more retention of reactivity against tTG/FN than sera from women without this kind of disorders ($P = 0.07$).

An inhibition assay was also carried out with five selected sera that exhibited differential behavior in a previous assay; inhibition up to 70% was confirmed with sera that showed a significant decrease in the reactivity against tTG in comparison with tTG-FN, while no inhibition was obtained with two sera that showed no changes in reactivity between tTG and tTG-FN (data not shown).

Effects of Patient Sera on tTG Transamidating Activity

The next step was to study the effect of sera on the transamidating activity of guinea pig tTG and to analyze whether differential clinical patterns could be correlated to putative changes in enzymatic activity.

We used the microtiter plate assay that measures the cross-linking of amines to human FN as immobi-

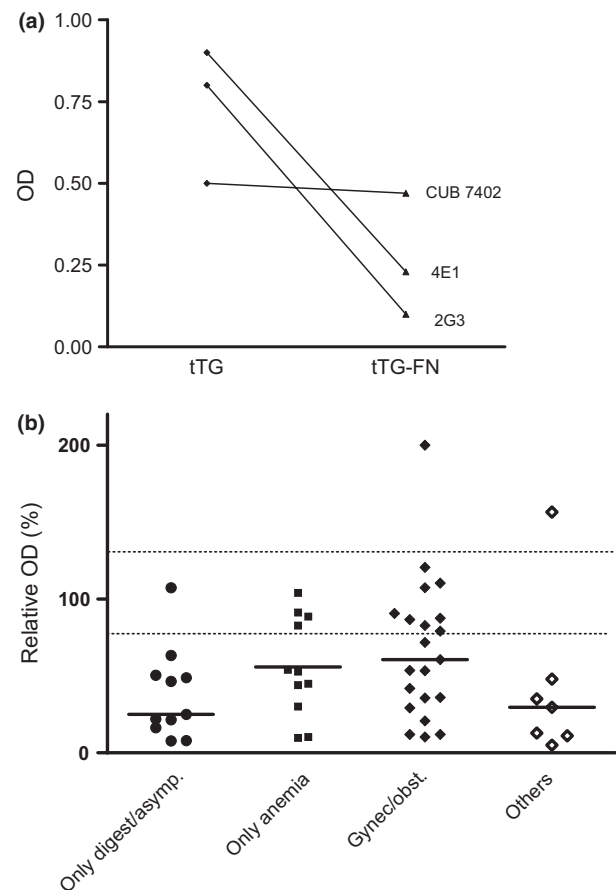


Fig. 1 (a) Comparison of reactivity against tissue transglutaminase (tTG) and tTG- fibronectin (FN) determined by ELISA, for three IgG monoclonal antibodies (CUB 7402, 4E1, 2G3). Mean optical densities (OD) obtained in duplicate assays run in parallel are indicated. (b) Each point represent IgA relative reactivity against tTG and tTG-FN defined as $OD(\%) = OD_{FN-tTG} \times 100 / OD_{tTG}$. Dotted lines delimit the region for 30% of variation between serum reactivity in standard and modified ELISA run in parallel (tTG and tTG-FN in solid phase respectively).

lized large glutamine acceptor protein substrate. In contrast to control sera, when the enzyme was pre-incubated with some anti-tTG-positive serum before adding the substrate, biotinylation was inhibited demonstrating the ability of CD autoantibodies to alter the activity of tTG. The inhibition of tTG activity by the competitive inhibitor Monodansyl cadaverine was evaluated in parallel in each plate, and a mean remaining activity of 50% was observed.

The approach selected was the preincubation of tTG with equal dilutions of sera; under this condition, differential behaviors were observed in patients; 16 of 50 of the sera from patients that made up the

whole group inhibited the basal activity, while two sera induced an increase in enzymatic activity. Interestingly, most of the sera that caused a decrease in activity belonged to the group of women with a history of gynecological/obstetric problems (11/21), significant correlation ($P = 0.021$, chi-square test) was observed between this clinical feature and results from *in vitro* assay (Table I).

In addition, a significant difference was also obtained between the relative activity values obtained with sera of women with history of gynecological and obstetric complaints and healthy donors or celiac women without extra-digestive symptoms ($P = 0.0306$ and $P = 0.277$ respectively, Mann–Whitney test); a further analysis according the type of complaint showed an heterogeneous pattern within this group, sera from women with previous miscarriages or gynecological abnormalities

reached maximal inhibition of enzymatic activity (Fig. 2).

As the presence of other autoantibodies has been associated with miscarriages and other related problems,^{42,43} the presence of anticardiolipin antibodies in sera was screened. In the group of 21 women with gynecological/obstetric problems, five of them presented IgM or IgG antibodies against cardiolipin (four and one, respectively), thus cannot be ruled out that these autoantibodies could contribute to any extra-digestive disorder by other mechanisms.

Serological Reactivity to Placental Tissue

According to tissue availability, normal term placenta was used as a representative maternal–fetal-derived tissue where tTG is highly expressed.²⁷ Strong staining of the syncytial microvillous membrane and vascular

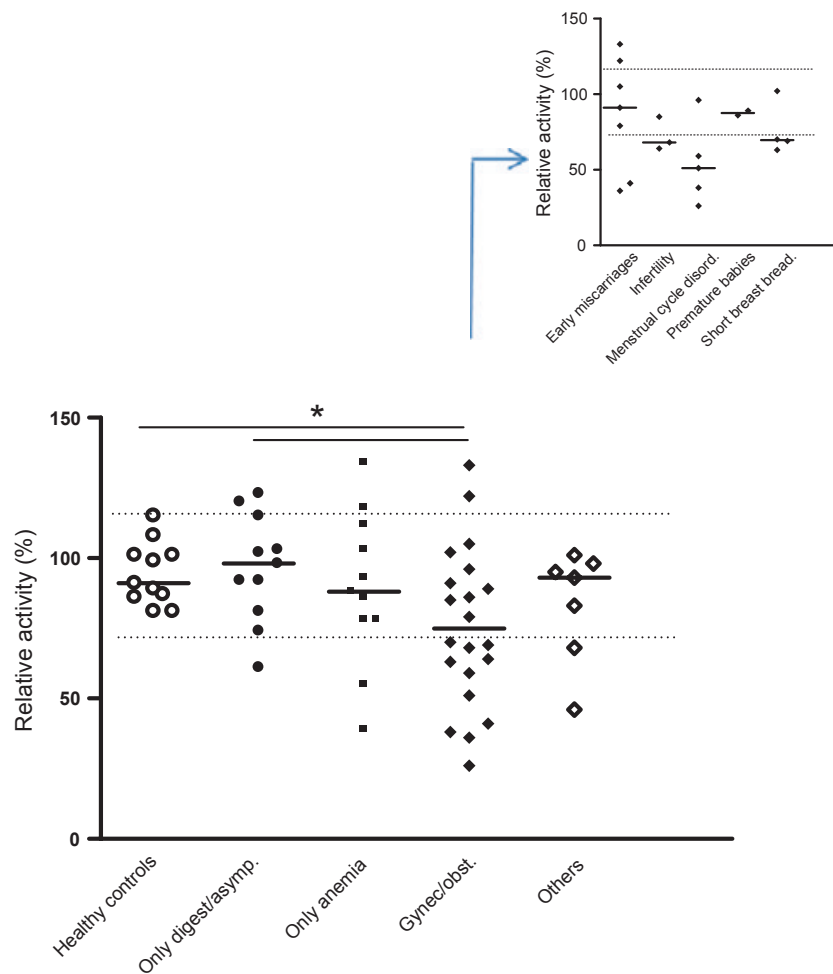


Fig. 2 Relative transamidating activity defined as activity (%) = $OD_{\text{serum}} \times 100 / OD_{\text{basal}}$ is indicated for each individual. Dotted lines delimit the region defined by the mean plus two standard deviation of activity (%) for control group (healthy individuals). *Significant difference with the group of women without extra-digestive symptoms ($P = 0.0277$) and with control group ($P = 0.0306$), Mann–Whitney test.

elements was verified with tTG 4E1-specific reference antibody accordingly to previous data^{27,44} (Fig. 3c). Sera from women that had reported gynecological/obstetric disorders showed a similar pattern and recognized syncytial microvillous membrane as previously described.³² The intensity of staining was variable, suggesting a non-uniform distribution of tTG over the surface of the villous (Fig. 3a,b, one representative staining is shown).

Serological Reactivity to Thyroid Tissue

Thyroid dysfunction is a very common disorder reported in women with CD,⁴⁵ and it was observed in our study group as the third most commonly documented extra-digestive disorder (10/50); only one of them exhibited antithyroid antibodies detected by TPO ELISA, though no classical IIF pattern was observed.

The expression tTG in thyroid tissue has been reported in epithelial cells and also in the extracellular matrix in the interfollicular area;⁴⁶ thus, it could be speculated that the presence of antibodies against extracellular thyroid tTG could contribute to thyroid dysfunction or predict the onset of autoimmune thyroid disease.

We analyzed the presence of suggestive patterns of tTG-specific immunostaining in commercial sections of monkey thyroid tissue with sera from patients

without anti-TPO antibodies, and compared the patterns with those obtained with sera from patients with typical autoimmune hypothyroidism.

Interestingly, two patients with symptoms and eight patients without clinical signs of hypothyroidism at the moment of CD onset, all lacking specific TPO antibodies, had specific IgA reactivity against thyroid tissue. In these cases the fluorescent signal detected was observed in the thyroid follicular epithelial cells; when the tissue was examined at higher magnification, we observed the presence of a fluorescence signal/fluorescence signals in the extracellular matrix of the interfollicular areas (Fig. 4d, one representative serum). This pattern is different from the typical anti-thyroid labelling (Fig. 4a) and comparable with the pattern observed with the reference antibody (CUB 7402) (Fig. 4c), and it is also consistent with previous work that describes specific tTG immunostaining in monkey thyroid tissue.⁴⁶

Discussion

Celiac disease may have implications on menstrual and reproductive health. The association between CD and women's reproductive and gynaecological disorders is widely documented,^{7,13–17} though the mechanisms underlying these complaints are unknown.

Immunologic mechanisms can be postulated on the basis of the presence of antibodies against tTG,

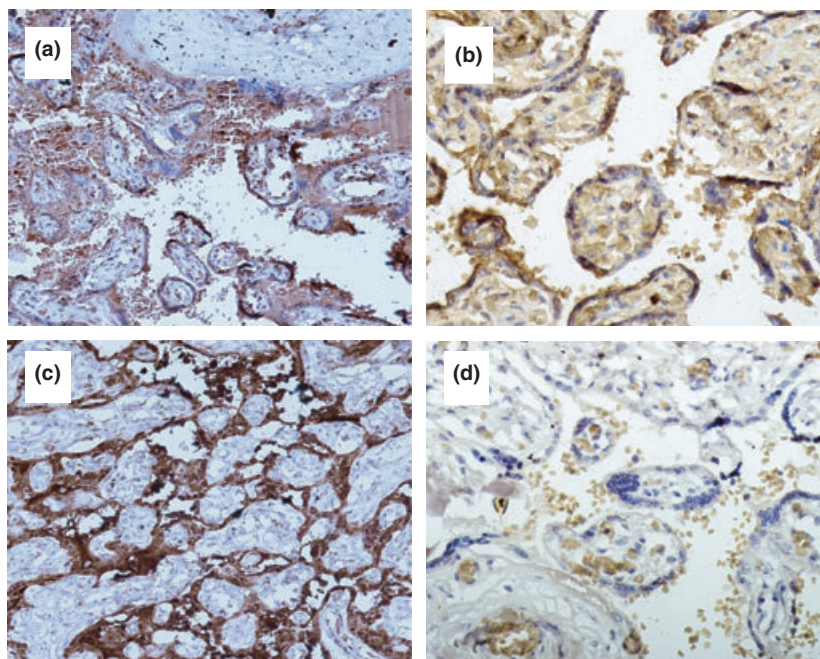


Fig. 3 Immunohistochemical pattern of term placental tissue (a) and (b) serum from celiac patient with history of obstetric problems; binding of IgA at the syncytial surface is shown at 200x and 400x magnification, respectively. One representative staining is shown. (c) Reference anti-tissue transglutaminase (tTG) MoAb (4E1) staining of syncytiotrophoblast is shown at 200x. (d) Negative serum control, 400x.

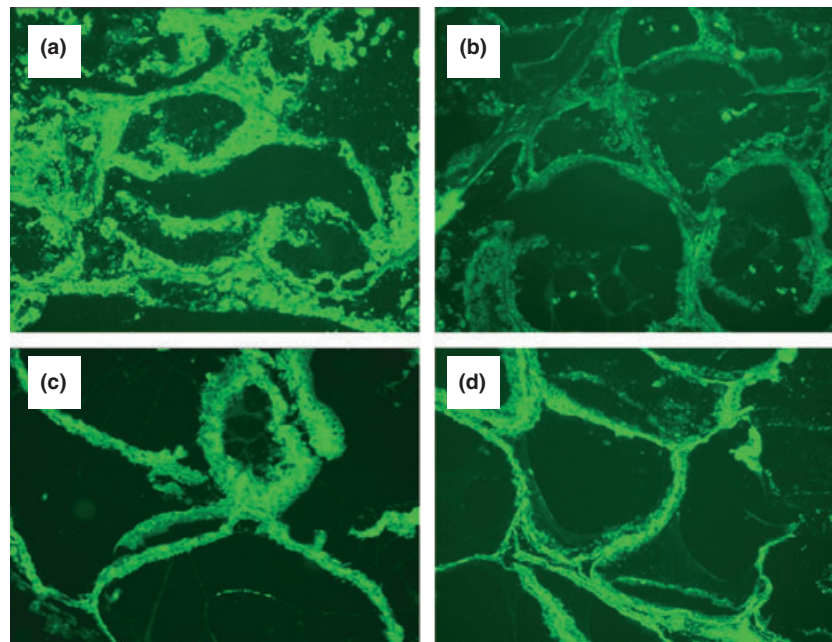


Fig. 4 Indirect immunofluorescence staining pattern of thyroid tissue. (a) Typical pattern obtained with human serum containing anti-thyroperoxidase (TPO) antibodies; (b) human negative serum; (c) reference anti-tissue transglutaminase (tTG) MoAb (CUB 7402); (d) celiac patient serum, without TPO-specific antibodies. One representative staining is shown. Magnification 200 $\times$.

an enzyme that participates in endometrial physiological processes throughout menstrual cycle, during decidualization and implantation.^{28,47} tTG was detected in human endometrial tissue from healthy women at the basal membrane of the glandular epithelium and surrounding stromal cells. A normal menstrual cycle implies several biological processes in which tTG can be directly involved through both enzymatic and non-catalytic mechanisms (cell proliferation and apoptosis of the functional layer of endometrium, angiogenesis, and changes in the endometrial extracellular matrix).^{47–49} In addition, tTG expression appears to be needed for progesterone-induced decidualization of human endometrial stromal cells,²⁶ suggesting that tTG is involved in the implantation process.²⁸

Antibodies against different functional regions of tTG have been documented,^{36,37,39–41} suggesting that qualitative differences in the serological profile of celiac patients could condition a clinical manifestation, because different biological functions mediated by tTG could be modified in tissues.

As a first approach to investigate the involvement of immunologic mechanisms in systemic celiac pathogenesis, we analyzed the correlation between extradigestive symptoms and the *in vitro* effect of serum in two experimental assays that evaluated the reactivity of each serum against FN-linked tTG and its effect on transamidating activity.

Our results suggest the expression of a heterogeneous distribution of fine specificity tTG IgA antibodies in patients that made up the study group, as differential behaviors were observed in both assays.

A significant correlation ($P = 0.021$) was established between the presence of a history of gynaecological and/or obstetric complications and the capability of sera to modify *in vitro* transamidating activity (Table I); interestingly, sera from the group of women with antecedents of gynaecological/obstetric disorders significantly induced higher inhibition of tTG activity than those sera derived from healthy donors ($P = 0.0306$) or celiac women without these type of complaints ($P = 0.0346$). Further analysis shows that maximal inhibition was achieved with sera derived from women with previous miscarriages and alterations of menstrual cycle (Fig. 2).

Tissue transglutaminase is widely expressed in early and term placenta with strong enzymatic activity at the syncytiotrophoblast microvillous membrane, the primary interface between maternal and fetal tissue where it is exposed to maternal circulating antibodies; placental tTG is recognized by commercial antibodies^{27,44} and by positive tTG IgA sera from non-pregnant donors that inhibited its enzymatic activity *in situ*.³²

We analyzed whether sera from celiac women with obstetric disorders stained normal placental tissues, selected as a representative maternal–fetal

interface tissue. Early miscarriages were reported in seven women prior to the diagnosis of celiac disease; sera obtained from two of them strongly decreased the *in vitro* enzymatic activity, and its reactivity against human placenta slices was corroborated (Fig. 3), showing a pattern similar to that obtained with 4E1 MoAb, suggesting tTG-specific staining. We verified for the first time that sera from women with prior miscarriages have the potential to recognize placental tissue and alter tTG transamidating activity *in vitro*. These results can support the idea that tTG impairment function in the uterus and embryo–maternal interface could contribute to this kind of gynecological and obstetric disorders.

In addition to the enzymatic activity of extracellular tTG, its function as a β -integrin coreceptor is involved in cell adhesion, spreading and migration through interaction with extracellular components.²⁴ The presence of antibodies directed to the site of interaction of surface tTG and FN can be indirectly assumed in most patients, as sera reactivity decreased when tTG was linked to FN. Although these results did not correlate with any clinical profile, in some patients, anti-tTG antibodies could contribute to disorders by altering central events in processes like implantation cell migration and tissue remodeling.

Gynecological and obstetric disorders are multifactorial; hormonal and nutrient deficiencies as well as other autoimmune conditions could contribute to the disorders reported in our study group. Untreated hypothyroidism can cause menstrual cycle problems and can affect pregnant women and their babies.⁵⁰ In our study group, ten women had antecedents of clinical hypothyroidism, four of them with a history of gynecological/obstetric disorders: delayed menarche (2), sterility (1), and premature delivery (1); thus, it cannot be ruled out that such endocrine disorders contributed to the gynecological/obstetric symptoms in these women.

Tissue transglutaminase is found in thyroid tissue, and a role for CD as a factor in the development of autoimmune thyroid disease induced via autoantibodies is suggested by the fact that patients with autoimmune thyroid disease and CD showed an improvement in the endocrinal disorder while being under a strict gluten-free diet.^{45,51} In this context, we explored the possibility that asymptomatic thyroid disease could be masked in celiac patients; interestingly, we demonstrated that the anti-tTG IgA-positive serum from 11 patients with celiac disease, without

clinical signs of thyroid dysfunction and lack of TPO-specific antibodies, stained thyroid follicular cells as well as extracellular matrix in the interfollicular space. Similar reactivity patterns were obtained with tTG monoclonal antibody and sera from celiac patients, suggesting that tTG is the autoantigen recognized (Fig. 4). These results should be taken into account to evaluate thyroid function in celiac patients.

In conclusion, our results show significant correlation between the ability of sera to inhibit enzymatic tTG activity and the expression of gynecological and/or obstetric complaints during active disease; this work can support the hypothesis that anti-tTG antibodies can contribute to clinical picture, and further work is underway to decipher the mechanisms putatively involved.

Acknowledgments

Authors thank patients and ACELU (Asociación Celíaca del Uruguay) for cooperation and Dr. C. Servetto and QF. F. Antúnez (Laboratorio clínico, Hospital Maciel) for invaluable collaboration; authors are very grateful to Susan Holming for english revision of the manuscript and Dr. José Fuentes (Facultad de Química, Universidad de la República) for technical support with statistical analysis. The contributions made by experts clinicians in Gynecology and Obstetric, Dr. Verónica Fiol and Dr. Fernanda Nozar (Hospital Pereira Rossell, Facultad de Medicina, Universidad de la República) after comprehensive revision of the manuscript, are greatly appreciated by the authors. This work was supported by the Programa de Desarrollo Tecnológico, Dirección de Investigación y tecnología para el Desarrollo (Grant S/C/OP/76/59, AH); PEDECIBA (Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas, PNUD) and Agencia Nacional de Investigación e Innovación. Uruguay.

References

- 1 Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S, Elitsur Y, Green PH, Guandalini S, Hill ID, Pietzak M, Ventura A, Thorpe M, Kryszak D, Fornaroli F, Wasserman SS, Murray JA, Horvath K: Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med* 2003; 163:286–292.
- 2 Dube C, Rostom A, Sy R, Cranney A, Saloojee N, Garrity C, Sampson M, Zhang L, Yazdi F, Mamaladze V, Pan I, Macneil J, Mack D, Patel D, Moher D: The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk Western European populations: a systematic review. *Gastroenterology* 2005; 128:S57–S67.

- 3 Cataldo F, Montalto G: Celiac disease in the developing countries: a new and challenging public health problem. *World J Gastroenterol* 2007; 13:2153–2159.
- 4 Collin P, Kaukinen K, Maki M: Clinical features of celiac disease today. *Dig Dis* 1999; 17:100–106.
- 5 Ransford RA, Hayes M, Palmer M, Hall MJ: A controlled, prospective screening study of celiac disease presenting as iron deficiency anemia. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35:228–233.
- 6 Kempainen T, Kroger H, Janatuinen E, Arnala I, Kosma VM, Pikkarainen P, Julkunen R, Jurvelin J, Alhava E, Uusitupa M: Osteoporosis in adult patients with celiac disease. *Bone* 1999; 24:249–255.
- 7 Rostami K, Steegers EA, Wong WY, Braat DD, Steegers-Theunissen RP: Coeliac disease and reproductive disorders: a neglected association. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 96:146–149.
- 8 Meloni GF, Dessole S, Vargiu N, Tomasi PA, Musumeci S: The prevalence of coeliac disease in infertility. *Hum Reprod* 1999; 14:2759–2761.
- 9 Bardella MT, Fredella C, Saladino V, Trovato C, Cesana BM, Quatrini M, Prampolini L: Gluten intolerance: gender- and age-related differences in symptoms. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40:15–19.
- 10 Ozgor B, Selimoglu MA: Coeliac disease and reproductive disorders. *Scand J Gastroenterol* 2010; 45:395–402.
- 11 Soni S, Badawy SZ: Celiac disease and its effect on human reproduction: a review. *J Reprod Med* 2010; 55:3–8.
- 12 Shuster LT, Rhodes DJ, Gostout BS, Grossardt BR, Rocca WA: Premature menopause or early menopause: long-term health consequences. *Maturitas* 2010; 65:161–166.
- 13 Molteni N, Bardella MT, Bianchi PA: Obstetric and gynecological problems in women with untreated celiac sprue. *J Clin Gastroenterol* 1990; 12:37–39.
- 14 Smecuol E, Maurino E, Vazquez H, Pedreira S, Niveloni S, Mazure R, Boerr L, Bai JC: Gynaecological and obstetric disorders in coeliac disease: frequent clinical onset during pregnancy or the puerperium. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996; 8:63–89.
- 15 Stazi AV, Mantovani A: A risk factor for female fertility and pregnancy: celiac disease. *Gynecol Endocrinol* 2000; 14:454–463.
- 16 Ciacci C, Cirillo M, Auriemma G, Di Dato G, Sabbatini F, Mazzacca G: Celiac disease and pregnancy outcome. *Am J Gastroenterol* 1996; 91:718–722.
- 17 Martinelli P, Troncone R, Paparo F, Torre P, Trapanese E, Fasano C, Lamberti A, Budillon G, Nardone G, Greco L: Coeliac disease and unfavourable outcome of pregnancy. *Gut* 2000; 46:332–335.
- 18 Alaedini A, Green PH: Narrative review: celiac disease: understanding a complex autoimmune disorder. *Ann Intern Med* 2005; 142:289–298.
- 19 Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D: Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 1997; 3:797–801.
- 20 Sblattero D, Berti I, Trevisiol C, Marzari R, Tommasini A, Bradbury A, Fasano A, Ventura A, Not T: Human recombinant tissue transglutaminase ELISA: an innovative diagnostic assay for celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:1253–1257.
- 21 Fesus L, Piacentini M: Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends Biochem Sci* 2002; 27:534–539.
- 22 Aeschlimann D, Thomazy V: Protein crosslinking in assembly and remodelling of extracellular matrices: the role of transglutaminases. *Connect Tissue Res* 2000; 41:1–27.
- 23 Upchurch HF, Conway E, Patterson MK Jr, Maxwell MD: Localization of cellular transglutaminase on the extracellular matrix after wounding: characteristics of the matrix bound enzyme. *J Cell Physiol* 1991; 149:375–382.
- 24 Akimov SS, Belkin AM: Cell surface tissue transglutaminase is involved in adhesion and migration of monocytic cells on fibronectin. *Blood* 2001; 98:1567–1576.
- 25 Toth B, Garabuczi E, Sarang Z, Vereb G, Vamosi G, Aeschlimann D, Blasko B, Becsi B, Erdodi F, Lacy-Hulbert A, Zhang A, Falasca L, Birge RB, Balajthy Z, Melino G, Fesus L, Szondy Z: Transglutaminase 2 is needed for the formation of an efficient phagocyte portal in macrophages engulfing apoptotic cells. *J Immunol* 2009; 182:2084–2092.
- 26 Fujimoto M, Kanzaki H, Nakayama H, Higuchi T, Hatayama H, Iwai M, Kaneko Y, Mori T, Fujita J: Requirement for transglutaminase in progesterone-induced decidualization of human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 1996; 137:1096–1101.
- 27 Robinson NJ, Glazier JD, Greenwood SL, Baker PN, Aplin JD: Tissue transglutaminase expression and activity in placenta. *Placenta* 2006; 27:148–157.
- 28 Kabir-Salmani M, Shiokawa S, Akimoto Y, Sakai K, Iwashita M: Tissue transglutaminase at embryo-maternal interface. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:4694–4702.
- 29 Korponay-Szabo IR, Halttunen T, Szalai Z, Laurila K, Kiraly R, Kovacs JB, Fesus L, Maki M: *In vivo* targeting of intestinal and extraintestinal transglutaminase 2 by coeliac autoantibodies. *Gut* 2004; 53:641–648.
- 30 Hadjivassiliou M, Maki M, Sanders DS, Williamson CA, Grunewald RA, Woodroffe NM, Korponay-Szabo IR: Autoantibody targeting of brain and intestinal transglutaminase in gluten ataxia. *Neurology* 2006; 66:373–377.
- 31 Kiraly R, Vecsei Z, Demenyi T, Korponay-Szabo IR, Fesus L: Coeliac autoantibodies can enhance transamidating and inhibit GTPase activity of tissue transglutaminase: dependence on reaction environment and enzyme fitness. *J Autoimmun* 2006; 26:278–287.
- 32 Anjum N, Baker PN, Robinson NJ, Aplin JD: Maternal celiac disease autoantibodies bind directly to syncytiotrophoblast and inhibit placental tissue transglutaminase activity. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7:16.
- 33 Myrsky E, Caja S, Simon-Vecsei Z, Korponay-Szabo IR, Nadalutti C, Collighan R, Mongeot A, Griffin M, Maki M, Kaukinen K, Lindfors K: Celiac disease IgA modulates vascular permeability *in vitro* through the activity of transglutaminase 2 and RhoA. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66:3375–3385.
- 34 Myrsky E, Kaukinen K, Syrjanen M, Korponay-Szabo IR, Maki M, Lindfors K: Coeliac disease-specific autoantibodies targeted against transglutaminase 2 disturb angiogenesis. *Clin Exp Immunol* 2008; 152:111–119.
- 35 Barone MV, Caputo I, Ribocco MT, Maglio M, Marzari R, Sblattero D, Troncone R, Auricchio S, Esposito C: Humoral immune response to tissue transglutaminase is related to epithelial cell proliferation in celiac disease. *Gastroenterology* 2007; 132:1245–1253.
- 36 Seissler J, Wohlrab U, Wuensche C, Scherbaum WA, Boehm BO: Autoantibodies from patients with coeliac disease recognize distinct functional domains of the autoantigen tissue transglutaminase. *Clin Exp Immunol* 2001; 125:216–221.
- 37 Nakachi K, Powell M, Swift G, Amoroso MA, Ananieva-Jordanova R, Arnold C, Sanders J, Furmaniak J, Rees Smith B: Epitopes recognised by tissue transglutaminase antibodies in coeliac disease. *J Autoimmun* 2004; 22:53–63.
- 38 Teesalu K, Agardh D, Panarina M, Utt M, Uibo O, Uibo R: A modified ELISA for improved detection of IgA, IgG, and IgM

- anti-tissue transglutaminase antibodies in celiac disease. *Clin Chim Acta* 2009; 403:37–41.
- 39 Di Niro R, Ferrara F, Not T, Bradbury AR, Chirido F, Marzari R, Sblattero D: Characterizing monoclonal antibody epitopes by filtered gene fragment phage display. *Biochem J* 2005; 388:889–894.
 - 40 Sblattero D, Florian F, Azzoni E, Zyla T, Park M, Baldas V, Not T, Ventura A, Bradbury A, Marzari R: The analysis of the fine specificity of celiac disease antibodies using tissue transglutaminase fragments. *Eur J Biochem* 2002; 269:5175–5181.
 - 41 Marzari R, Sblattero D, Florian F, Tongiorgi E, Not T, Tommasini A, Ventura A, Bradbury A: Molecular dissection of the tissue transglutaminase autoantibody response in celiac disease. *J Immunol* 2001; 166:4170–4176.
 - 42 Hill JA: Immunological mechanisms of pregnancy maintenance and failure: a critique of theories and therapy. *Am J Reprod Immunol* 1990; 22:33–41.
 - 43 Ogasawara M, Aoki K, Katano K, Aoyama T, Kajiura S, Suzumori K: Prevalence of autoantibodies in patients with recurrent miscarriages. *Am J Reprod Immunol* 1999; 41:86–90.
 - 44 Hager H, Gliemann J, Hamilton-Dutoit S, Ebbesen P, Koppelhus U, Jensen PH: Developmental regulation of tissue transglutaminase during human placentation and expression in neoplastic trophoblast. *J Pathol* 1997; 181:106–110.
 - 45 Sategna-Guidetti C, Volta U, Ciacci C, Usai P, Carlino A, De Franceschi L, Camera A, Pelli A, Brossa C: Prevalence of thyroid disorders in untreated adult celiac disease patients and effect of gluten withdrawal: an Italian multicenter study. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:751–757.
 - 46 Naiyer AJ, Shah J, Hernandez L, Kim SY, Ciaccio EJ, Cheng J, Manavalan S, Bhagat G, Green PH: Tissue transglutaminase antibodies in individuals with celiac disease bind to thyroid follicles and extracellular matrix and may contribute to thyroid dysfunction. *Thyroid* 2008; 18:1171–1178.
 - 47 Signorini M, Pansini F, Bonaccorsi G, Mollica G, Ferrari C, Bergamini CM: Regulation of endometrial transglutaminase activity during the menstrual cycle. *Biochem Int* 1988; 16:77–82.
 - 48 Li Q, Bagchi MK, Bagchi IC: Identification of a signaling pathway involving progesterone receptor, calcitonin, and tissue transglutaminase in Ishikawa endometrial cells. *Endocrinology* 2006; 147:2147–2154.
 - 49 Deng L, Shipley GL, Loose-Mitchell DS, Stancel GM, Broaddus R, Pickar JH, Davies PJ: Coordinate regulation of the production and signaling of retinoic acid by estrogen in the human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:2157–2163.
 - 50 Wier FA, Farley CL: Clinical controversies in screening women for thyroid disorders during pregnancy. *J Midwifery Womens Health* 2006; 51:152–158.
 - 51 Mainardi E, Montanelli A, Dotti M, Nano R, Moscato G: Thyroid-related autoantibodies and celiac disease: a role for a gluten-free diet? *J Clin Gastroenterol* 2002; 35:245–248.

Efectos de los anti-tTG sobre la funcionalidad de las células trofoblásticas y los macrófagos en un modelo celular *in vitro* representativo de la interfase materno-fetal

En este capítulo se describen los resultados obtenidos en relación al segundo y cuarto objetivo del trabajo, vinculados a las funciones biológicas de la tTG en la interfase materno-fetal y la posible acción de los anticuerpos específicos a este nivel y a la profundización en los posibles mecanismos moleculares implicados. La mayor parte de los resultados están contenidos en la publicación adjunta (Art 2):

“Tissue transglutaminase on trophoblast cells as a possible target of autoantibodies contributing to pregnancy complications in celiac patients”.

Sóñora C, Calo G, Fraccaroli L, Pérez-Leirós C, Hernández A, Ramhorst R. *Am J Reprod Immunol* 2014;72:485-495.

En esta sección se incorpora trabajo adicional realizado en el contexto de estos objetivos.

A continuación se resumen los antecedentes específicos, principales resultados y sus implicancias.

En esta etapa se continuó el trabajo con algunos de los sueros de las pacientes con trastornos reproductivos, particularmente aquellas con historia de abortos recurrentes e infertilidad caracterizados en el Capítulo 2.

3.1 La tTG en el trofoblasto y la modulación de su función por los autoanticuerpos.

La implantación embrionaria es un proceso complejo que involucra la unión del blastocisto al epitelio endometrial y a continuación la invasión de éste por las células trofoblásticas.

Como se mencionó en la introducción general la tTG se expresa tanto en células maternas como fetales; en primera instancia nos focalizamos en su expresión a nivel del trofoblasto, la interfase primaria entre los tejidos maternos y fetales y donde la enzima está en contacto directo con la sangre de la madre y por lo tanto a ese nivel los autoanticuerpos contra tTG, generados durante la enfermedad no tratada, podrían interferir con sus funciones biológicas.

Luego que se completa la adhesión, las células trofoblásticas (de origen epitelial) se diferencian en el sinciotrofoblasto (STB) externo y el citotrofoblasto (CTB) interno.

Las vellosidades flotantes están compuestas por dos capas trofoblásticas, una interna de células mononucleadas del CTB y una capa externa de STB resultante de la diferenciación y fusión celular del CTB.

El STB cubre la totalidad de la superficie de la vellosidad y está en contacto directo con la sangre materna en el espacio intervilloso ya que los primates más evolucionados al igual que los roedores presentan placenta hemocorial (Figura 9). Estas células, debido a su localización específica, son claves en el intercambio de gases y nutrientes entre la madre y el embrión. Algunas células del CTB, en sitios específicos de la vellosidad, pueden sufrir una segunda diferenciación abandonando la membrana basal de la vellosidad, proliferando y agregándose a la columna de anclaje de la misma en la pared uterina.

Este tejido trofoblástico extravellositario (EVT) invasor, comprende una población heterogénea de células trofoblásticas, gigantes, multinucleadas, placentares, que invaden las arterias espirales uterinas y adoptan un fenotipo vascular con expresión de marcadores de superficie endoteliales.

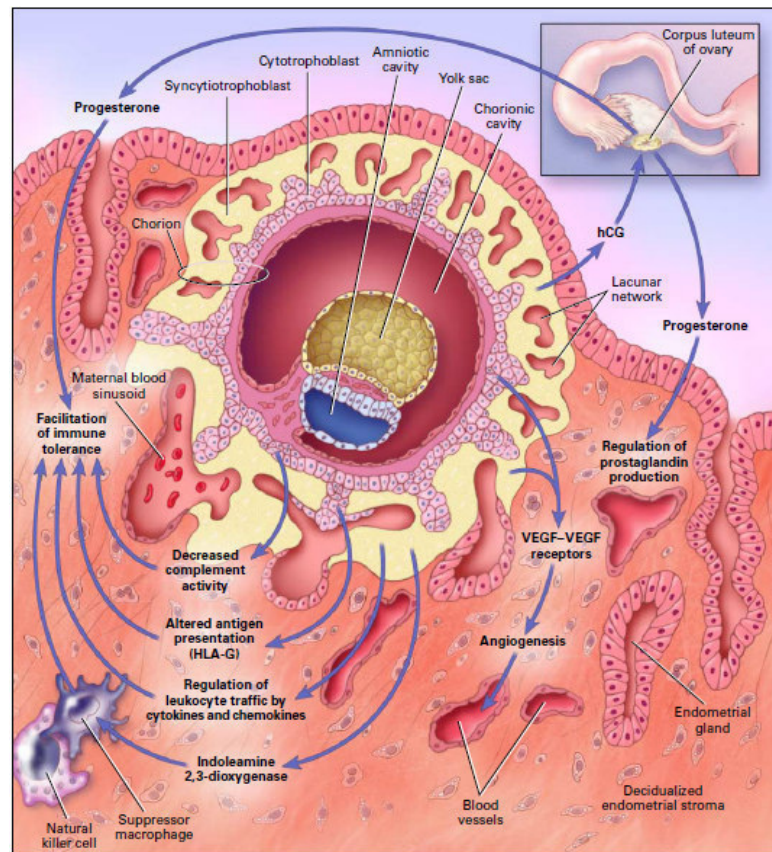


Figura 9. Rol del trofoblasto en el mantenimiento de la gestación.

Se esquematizan los principales procesos biológicos y mediadores solubles implicados en la etapa de implantación temprana (aprox. 14 días post-concepción) Tomado de *Implantation and the survival of early pregnancy* (Norwitz, Schust et al. 2001)

El STB tiene la capacidad de producir varias enzimas líticas que degradan la MEC y de secretar factores que desencadenan la apoptosis de las células epiteliales endometriales, consiguiendo así entrar a través del epitelio endometrial sorteando la barrera de la lámina basal para así conseguir que el blastocisto se aloje en el estroma endometrial (implantación). En este camino el STB también orada parte de los revestimientos de los capilares maternos estableciendo un mecanismo primitivo de circulación utero-placentario para permitir el intercambio gaseoso y de nutrientes. El proceso de implantación temprana termina hacia la

segunda semana post-fertilización, luego de esto el blastocisto inicia la formación de las vellosidades primarias y secundarias (Norwitz, Schust et al. 2001)

En este escenario nos propusimos reproducir *in vitro* algunos de los procesos biológicos centrales que ocurren durante la implantación embrionaria y etapas posteriores de la gestación para así poder evaluar el posible efecto de los autoanticuerpos maternos en dichos procesos.

Para nuestro trabajo elegimos como modelo de célula trofoblástica la línea celular Swan-71 derivada de citotrofoblasto del primer trimestre (7^a semana) inmortalizada por transformación mediada por telomerasa (Straszewski-Chavez, Abrahams et al. 2009) para lo cuál se verificó en primera instancia la expresión de la tTG en la superficie de estas células ya que no había sido descrito anteriormente.

Detectamos la expresión de la tTG en las Swan-71 por western-blot y verificamos su expresión en la superficie celular por citometría de flujo. Para ello empleamos un anticuerpo monoclonal comercial específico para tTG humana (TG100, NeoMarkers, Denmark) y también se probaron los AcMos 4E1 y 2G3 (Di Niro, Ferrara et al. 2005) gentilmente cedidos por Dr. F. Chirido (Universidad Nacional LISIN-La Plata). Con ambas metodologías los mejores resultados se obtuvieron con el AcMo TG100 dirigido contra un epítipo localizado en la región catalítica de la tTG (aa 447-538). Además se confirmó el reconocimiento de la enzima expresada en la línea celular y en cortes de placenta humana utilizando algunas muestras de sueros de pacientes celíacos (Figura 1, Art.2).

Posteriormente procedimos a analizar el efecto de los anticuerpos anti-tTG en la adhesión y migración de células trofoblásticas.

Para ello se puso a punto el ensayo de migración celular de células trofoblásticas sobre FN. La visualización de la migración de éstas sobre placas de cultivo recubiertas de FN purificada del suero (Chifflet, Bolatto et al. 2004) se efectuó realizando un corte o herida (scratch) sobre cultivos confluentes y visualizando las células por microscopía óptica .

Se observó que en la incubación con el AcMo anti-tTG disminuyó el cerrado de la herida en comparación con la condición control, observándose resultados similares en presencia de sueros de pacientes celíacos con anticuerpos IgA anti-tTG pero no en presencia de sueros control sin anticuerpos anti-tTG.

Los resultados fueron cuantificados mediante la relación existente entre el ancho inicial de la herida y el mismo a las 8hs (basal:8hs) (Figuras 2a y 2b, Art 2.)

El cierre de la herida implica varios procesos celulares como la adhesión a FN, la migración y eventualmente la proliferación.

Para explorar si la disminución del cierre en presencia de sueros de celíacos se podía atribuir al efecto de los anticuerpos anti-tTG en la migración de las células trofoblásticas realizamos ensayos mediante el sistema de transwell (poro 8 μ m) con las Swan-71 sembradas en el compartimento superior en ausencia y presencia del AcMo TG100, se las dejó migrar 48 hs hacia el compartimento inferior que contenía SFB al 20% como quimioattractante y posteriormente se cuantificó por microscopia el número de células en el compartimento inferior. Observamos aproximadamente un 15% de disminución en la tasa de migración en presencia del AcMo anti-tTG en comparación con la condición control en ausencia de dicho AcMo (Figura 2c, Art.2).

Dado que la tTG expuesta a nivel de la membrana es clave para la supervivencia y proliferación celular investigamos el efecto de los sueros de las celíacos y de controles normales sobre la proliferación de las células trofoblásticas.

En nuestros resultados (Figura 3a, Art.2) se observó que los sueros de las celíacos redujeron significativamente la incorporación de timidina tritiada en comparación con los sueros control.

Teniendo en cuenta entonces estos resultados, que indican que existe un menor nivel de proliferación de las células trofoblásticas en presencia de sueros de celíacos, nos preguntamos si estos autoanticuerpos podrían afectar la sobrevivencia de dichas células y promover la apoptosis.

Para responder esta interrogante analizamos el efecto de los anticuerpos anti-tTG en la apoptosis de las células trofoblásticas en condiciones de privación de nutrientes (ausencia de SFB por 24 hs).

Los resultados mostraron un incremento en el porcentaje de células apoptóticas (aproximadamente un incremento de 2.7 veces) con el AcMo TG100 y con sueros de pacientes se logró un incremento significativo de los niveles de apoptosis en comparación con sueros de pacientes controles (con similar contenido proteico) en los cuáles el porcentaje de células apoptóticas se mantiene similar al obtenido en la condición basal (Figura 3b y 3c, Art.2).

3.2 Efectos de los anticuerpos anti-tTG sobre los macrófagos.

En paralelo a la invasión trofoblástica, el endometrio uterino se decidualiza y es infiltrado por un gran número de células inmunes maternas, particularmente abundantes en el sitio de implantación de la decidua basal, que están en íntimo contacto con el trofoblasto extravellositario invasor (Norwitz, Schust et al. 2001) como se ilustra en la Figura 9, dentro de estas células centramos nuestro estudio en los macrófagos dado que estos se encuentran en un número importante en la decidua durante toda la gestación y que se ha demostrado que expresan tTG en su superficie (Hodrea, Demeny et al. 2010) la cuál actúa como co-receptor de las integrinas en el proceso de adhesión y migración de estas células (Akimov and Belkin 2001).

Dentro de las células del sistema inmune que colonizan la decidua materna las natural killer uterinas (uNK) constituyen hasta el 70% de la población en el primer trimestre del embarazo pero comienzan a sufrir apoptosis en forma masiva luego de la infiltración trofoblástica y al final del embarazo se encuentran prácticamente ausentes (Trundley and Moffett 2004).

Los macrófagos, constituyen en número la segunda población de leucocitos deciduales durante la gestación temprana (20-30%) y, a diferencia de las uNK, esta proporción se mantiene relativamente constante durante la gestación (Vince, Starkey et al. 1990).

La incomparable habilidad de los macrófagos de remodelar tejidos y secretar más de cien factores de crecimiento y citoquinas sugiere que estos tienen importantes funciones en la regulación de la implantación del blastocisto, el desarrollo de la placenta y la homeostasis decidual.

Las funciones de estas células son influenciadas por el microambiente tisular en el cuál residen; en la decidua estas células expresan moléculas que disminuyen la respuesta inflamatoria y promueven la remodelación tisular así como la tolerancia a los antígenos paternos del feto, un fenotipo que se asocia con el perfil regulador (Heikkinen, Mottonen et al. 2003; Cupurdija, Azzola et al. 2004). Estos macrófagos producen moléculas inmunomoduladoras como IL-10, prostaglandina E2 (PGE2), TGF- β 1 e indolamina dioxigenasa (IDO) que inhiben la proliferación de linfocitos.

Además expresan receptores para hormonas esteroideas como LH/hCG, y estrógenos (Miller and Hunt 1996; Zhang, Rao Ch et al. 2003), componentes del Complemento, inmunoglobulinas, citoquinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión y componentes de la MEC entre otras moléculas (Hunt, Miller et al. 1998) mientras que expresan bajos niveles de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 (Heikkinen, Mottonen et al. 2003).

La variedad de moléculas que secretan y el perfil de receptores que presentan sugieren un rol clave para estas células en la regulación de la función del trofoblasto, de hecho se localizan en forma adyacente a al CTB y en estrecha asociación con el trofoblasto invasor (Bulmer and Johnson 1984; Reister, Frank et al. 1999) y son capaces de interactuar con estas células a través de una variedad de pares receptor-ligando ya que expresan c-kit, vascular endothelial growth factor (VEGF), immunoglobulinlike transcript receptors (ILT) 2/4 y varios receptores de quimioquinas que se unen a las correspondientes moléculas del trofoblasto: Kit Ligand (Stem Cell Factor), VEGF Receptor-1 (VEGFR1), HLA-G y macrophage chemoattractant proteins (MCP) respectivamente (Sharkey, Jokhi et al. 1994; Petroff, Sedlmayr et al. 2002; He, Du et al. 2007).

Además existe evidencia de que las células trofoblásticas secretan varias quimioquinas que son capaces de atraer específicamente a los macrófagos (Fest, Aldo et al. 2007).

La secreción por parte de los macrófagos de proteasas, factores de crecimiento, moléculas quimiotácticas, citoquinas y componentes de la MEC les permite a estas células coordinar la remodelación tisular y la angiogénesis procesos claves en la implantación del blastocisto y el desarrollo placentario.

Otro componente importante de la remodelación tisular orquestada por los macrófagos es la inducción de apoptosis de las células no deseadas o dañadas así como el clearance eficiente de los cuerpos apoptóticos.

Durante el proceso de gestación normal la tasa de apoptosis es elevada en las células deciduales y trofoblásticas para regular la extensión de la invasión trofoblástica. (Reister, Frank et al. 2001; Mor and Abrahams 2003).

Más aún, las células trofoblásticas pueden inducir apoptosis de linfocitos maternos a través de la expresión de Fas-L, B7-H1 e IDO (Munn, Zhou et al. 1998; Guller and LaChapelle 1999; Petroff, Chen et al. 2002).

El clearance eficiente de las células apoptóticas es un componente esencial de la homeostasis tisular previniendo una reacción inflamatoria aberrante contra estos cuerpos apoptóticos así como la liberación del contenido extracelular. A nivel de la interfase materno-fetal este proceso es especialmente importante dado la naturaleza alogénica de los cuerpos apoptóticos derivados del trofoblasto (Mor and Abrahams 2003).

Los macrófagos activados en un perfil regulador muestran una capacidad muy importante de endocitosis y fagocitosis y expresan varios receptores que específicamente reconocen y median la captación de los cuerpos apoptóticos (Fadok and Chimini 2001; Van Ginderachter, Movahedi et al. 2006).

Más aún, se ha observado que el reconocimiento e ingestión por parte de los macrófagos de bajas cantidades de células apoptóticas refuerza su activación en un perfil regulador con una respuesta inmunomoduladora y anti-inflamatoria, encontrándose que la secreción de TNF α disminuye mientras que la de TGF- β 1 e IL-10 se incrementa luego de co-cultivar monocitos con linfocitos apoptóticos (Voll, Herrmann et al. 1997).

Otros estudios *in vivo* también han demostrado que la liberación de TGF- β 1 por parte de macrófagos que ingirieron células apoptóticas tiene efectos anti-inflamatorios (Huynh, Fadok et al. 2002).

Por otra parte, TGF- β 1 induce la expresión de tTG en los macrófagos, la cuál a su vez se requiere para la activación del TGF- β 1 latente en la MEC (Nunes, Gleizes et al. 1997) generándose entonces un bucle de amplificación que garantiza la eficiente remoción de las células apoptóticas, habiéndose propuesto que la producción alterada de citoquinas pro-inflamatorias por parte de los macrófagos tTG -/- se relaciona a la falta de activación de TGF- β 1 (Falasca, Iadevaia et al. 2005).

En este escenario nos propusimos analizar los efectos de los anti-tTG sobre la función de los macrófagos en el clearance de células apoptóticas y en la producción de citoquinas inmunoreguladoras.

Frente a la dificultad que implica disponer de cantidad suficiente de macrófagos humanos derivados de monocitos de sangre periférica de donantes se optó por trabajar con una línea celular pre-monocítica humana diferenciada a macrófagos mediante tratamiento con PMA 100 nm por 48 hs (THP-1, ATCC).

En primera instancia se verificó mediante citometría de flujo la expresión de la tTG a nivel de la superficie de las THP-1 diferenciadas, para ello se empleó el anticuerpo monoclonal comercial específico TG100 (NeoMarkers, Denmark) (Figura 10 a).

También comprobamos que los anticuerpos anti tTG de las pacientes con EC fueron capaces de unirse a la enzima expresada en la superficie de dichas células (Figura 10 b).

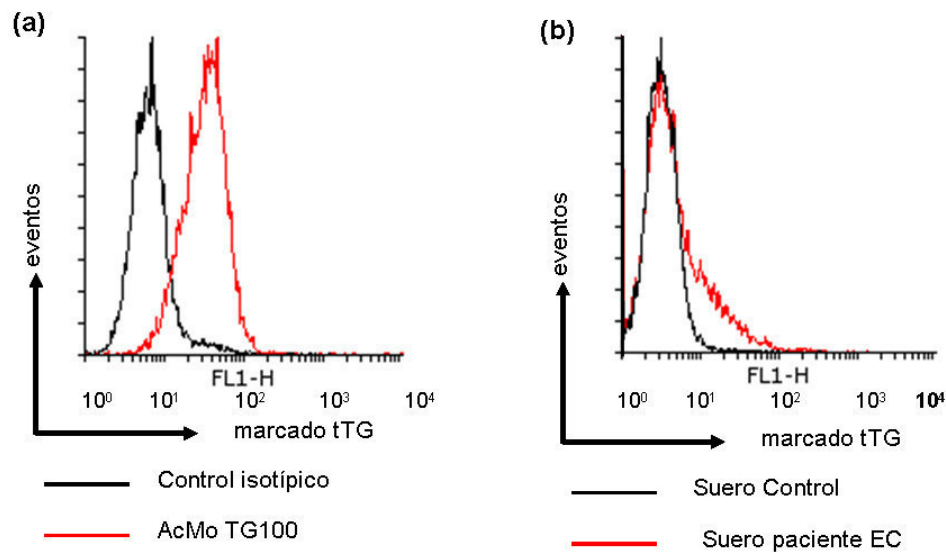


Figura 10. Detección de tTG por citometría de flujo en la superficie de células THP-1 diferenciadas en un ensayo representativo.

Las células se marcaron con el AcMo específico para tTG TG100 ($1\mu\text{g}/10^5$ células) y con el respectivo control específico **(a)** o con sueros procedentes de mujeres sanas o con EC (dil. 1:10) **(b)** y a continuación con anti-IgG de ratón-FITC (1: 100; Sigma-Aldrich) o anti-IgA humana-FITC (1:100; Sigma-Aldrich).

Para estudiar el efecto de los anticuerpos anti-tTG en el proceso de fagocitosis y en la producción de mediadores solubles inmunoreguladores por parte de los macrófagos durante dicho proceso fue necesario en primera instancia poner a punto el ensayo de fagocitosis de células trofoblásticas apoptóticas por parte de macrófagos diferenciados a partir de THP-1.

Los ensayos se realizaron a 37°C utilizando THP-1 diferenciadas y Swan-71 apoptóticas marcadas con CFSE en relación 1:1 en presencia del AcMo anti-tTG TG100 o de las muestras de suero de pacientes celíacos o control diluidas. El porcentaje de THP-1 que incorporaron células apoptóticas se determinó por citometría de flujo determinando el porcentaje de células $\text{CD45}^+\text{CFSE}^+$. Los resultados mostraron que el AcMo TG100 disminuyó el porcentaje de fagocitosis y que algunos sueros de pacientes celíacos fueron capaces también de inhibir este proceso en mayor grado que los sueros control (Figura 4a, Art.2). Si bien las diferencias no fueron significativas entre pacientes y controles, probablemente por la limitante en el número de sueros disponibles para el

ensayo, los resultados contundentes obtenidos con el AcMo sugieren que algunos de los anticuerpos contra la tTG podrían interferir en la fagocitosis por lo que nos propusimos investigar un posible mecanismo de interferencia.

MFG-E8 (milk fat globule-EGF factor 8) es una proteína de la familia de las discoidinas originalmente descrita como una proteína soluble de la leche pero posteriormente se descubrió que actuaba como molécula puente entre las células apoptóticas y los fagocitos siendo importante para el clearance de células apoptóticas (Hanayama, Tanaka et al. 2002; Hanayama, Tanaka et al. 2004). Esta molécula se une a la fosfatidil serina expuesta en las células apoptóticas y a las β integrinas en los fagocitos interaccionando también con la tTG lo que indicaría que la formación de este complejo ternario es necesario para que se dé en forma adecuada el proceso de fagocitosis (Toth, Garabuczi et al. 2009) (Figura 11).

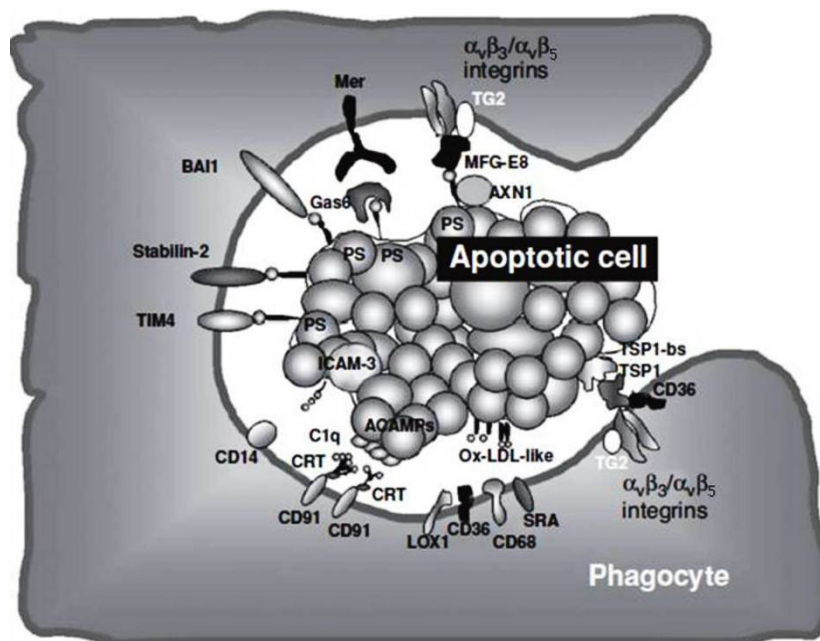


Figura 11. Receptores de superficie del macrófago vinculados a la captación de células apoptóticas.

Se muestra a la tTG (TG2) extracelular interactuando con integrinas y MFG-E8

Tomado de *Transglutaminase 2 dysfunctions in the development of autoimmune disorders: celiac disease and TtG^{-/-} mouse* (Szondy, Korponay-Szabo et al. 2011)

De acuerdo a nuestros resultados MFG-E8 es producida en cantidades significativas por las THP-1 diferenciadas y por lo tanto investigamos si los anticuerpos anti-tTG podrían interferir en la interacción entre la enzima y esta molécula.

Para esto en primer lugar diseñamos un ensayo *in vitro* con formato de ELISA de competencia en el cuál se incorporó sobre una placa, previamente sensibilizada con tTG, un anticuerpo policlonal de conejo contra esta enzima en diferentes diluciones y posteriormente se incorporó MFG-E8 recombinante en diferentes concentraciones.

Como se muestra en los resultados (Figura 4b, Art.2) los anticuerpos anti-tTG redujeron significativamente la unión de MFG-E8 a tTG y este efecto parece ser dosis dependiente.

Con este ensayo *in vitro* verificamos la posible inhibición por parte de los anticuerpos anti-tTG de la interacción entre estas dos moléculas.

A continuación exploramos a nivel celular, mediante el ensayo de fagocitosis, cuál es el rol de MFG-E8 analizando los sobrenadantes de cultivo por técnicas de ELISA (*Human MFG-E8 immunoassay Quantikine® ELISA R&D Systems*).

En primera instancia constatamos la producción de esta molécula por las Swan-71 durante el proceso de apoptosis, inducido mediante el tratamiento con Camptotecina (4μM) por 12 hs, y también en las THP diferenciadas.

En una segunda etapa analizamos que sucedía con la concentración de esta molécula en los sobrenadantes de los ensayos de fagocitosis realizados en presencia de sueros. Los resultados mostraron que la concentración de MFG-E8 disminuyó en los ensayos con sueros de pacientes celíacos en relación con aquellos en que se usaron sueros normales (*P = 0,048 t test) (Figura 12 a).

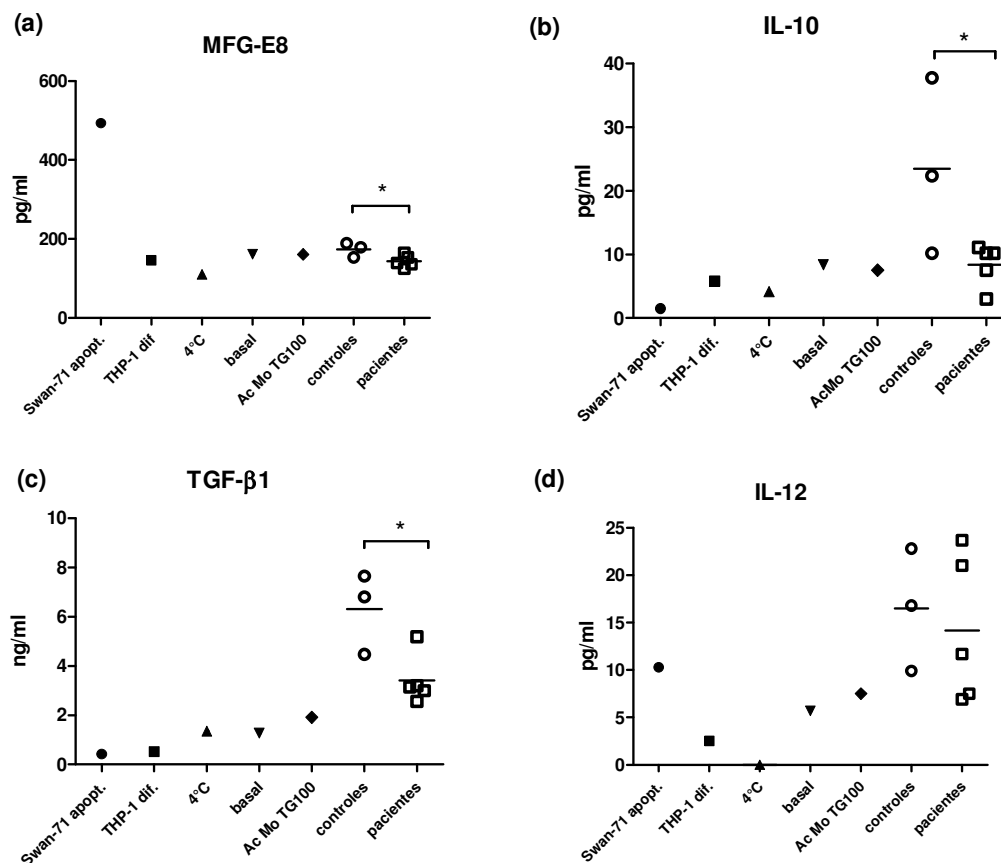


Figura 12. Dosificación de MFG-E8 y citoquinas en ensayos de fagocitosis.

Se analizó la producción de estos mediadores solubles en el sobrenadante de cultivo de Swan-71 apoptóticas (por tratamiento con Camptotecina 4 μ M por 12 hs); THP-1 diferenciadas (mediante tratamiento con PMA 100nm por 48 hs) y en ensayos de fagocitosis usando Swan-71 apoptóticas y THP diferenciadas (relación 1:1) durante 2 horas a 37 °C.

Los ensayos de fagocitosis se llevaron a cabo en ausencia de anticuerpos a 4°C (control de fagocitosis) y a 37°C (condición basal) y también (a 37°C) en presencia del AcMo TG100 (10 μ g/ml), sueros control o sueros de pacientes celíacos (1:50). La cuantificación de MFG-E8 **(a)** y las citoquinas IL-10 **(b)**, TGF-β1 **(c)** e IL-12 **(d)** en los sobrenadantes de los co-cultivos se realizó mediante técnicas de ELISA. Cada ensayo se realizó en triplicado.

Por otra parte, como se describió anteriormente, las citoquinas antiinflamatorias tienen un importante rol de en el proceso de fagocitosis y la tTG contribuye a la generación de la forma biológicamente activa del TGF-β1, entrecruzando el gran complejo latente de TGF-β1 (a través de latent TGF-β binding protein-1, LTBP1) a la MEC a partir de dónde el TGF-β1 activo puede ser subsecuentemente

liberado por proteólisis (Nunes, Gleizes et al. 1997; Verderio, Gaudry et al. 1999; Hofstra, Bos et al. 2001).

En base a los resultados previos que muestran que los anticuerpos contra la tTG interfieren en la fagocitosis analizamos que sucedió con el nivel de dichas citoquinas durante los ensayos de fagocitosis en presencia de los anticuerpos anti-tTG para dilucidar si este efecto podía deberse en parte a que dichos anticuerpos interfirieran en el entrecruzamiento del TGF- β 1 latente a la MEC para su posterior activación.

Se determinaron los niveles de IL-10 y TGF- β 1 en los sobrenadantes de los co-cultivos por técnica de ELISA (*OptEIA™ Set Human IL-10 y OptEIA™ Set Human TGF- β 1, BD*) y encontramos que en presencia de los sueros de las pacientes celíacas se observó una disminución estadísticamente significativa de la producción de IL-10 (*P = 0,05 t test) y TGF- β 1 (*P = 0,02 t test) comparado con los resultados obtenidos con los sueros procedentes de las mujeres sanas (Figura 12 b y c respectivamente).

En paralelo se analizaron también los niveles de IL-12 como representante de las citoquinas del perfil inflamatorio clásico de los macrófagos (*OptEIA™ Set Human IL-12(p70), BD*) no hallándose en este caso diferencias significativas entre los resultados con ambos grupos de sueros (Figura 12 d).

En resumen, los resultados de esta parte del trabajo muestran que la línea trofoblástica Swan-71 expresa tTG y que el suero de las pacientes celíacas disminuye el proceso de reparación tisular de monocapas de esta línea celular, en comparación con lo que sucede con sueros normales. Este efecto se acompaña de una disminución en la tasa de migración celular a las 48 hs de cultivo. Además, los sueros de pacientes celíacas reducen significativamente la proliferación celular e incrementan la tasa de apoptosis en relación a lo observado con sueros normales.

Por otra parte, hemos observado que los autoanticuerpos anti-tTG interfieren en el clearance de los cuerpos apoptóticos trofoblásticos a través de un mecanismo que involucraría la unión de tTG a MFG-E8 y también provocan una menor producción de las citoquinas anti-inflamatorias TGF- β 1 e IL-10.

Artículo 2

Tissue Transglutaminase on Trophoblast Cells as a Possible Target of Autoantibodies Contributing to Pregnancy Complications in Celiac Patients

Cecilia Sónora^{1,2}, Guillermina Calo³, Laura Fraccaroli³, Claudia Pérez-Leirós³, Ana Hernández^{1,*}, Rosanna Ramhorst^{3,*}

¹Immunology Laboratory, School of Sciences/School of Chemistry, Montevideo, Uruguay;

²EUTM-School of Medicine UDELAR, Montevideo, Uruguay;

³Immunopharmacology Laboratory, School of Sciences, University of Buenos Aires and National Research Council (IQUIBICEN-CONICET), Buenos Aires, Argentina

Keywords

Celiac patients, pregnancy complications, tissue transglutaminase

Correspondence

Rosanna Ramhorst, Laboratory of Immunopharmacology, IQUIBICEN-CONICET, School of Sciences, University of Buenos Aires, Int. Guiraldes 2160, Ciudad Universitaria, Pabellón 2 Piso 4. (C1428EHA) Buenos Aires, Argentina.
E-mail: rramhorst@qb.fcen.uba.ar

*Both Senior researchers contributed equally to this work.

Submission April 3, 2014;
accepted June 23, 2014.

Citation

Sónora C, Calo G, Fraccaroli L, Pérez-Leirós C, Hernández A, Ramhorst R. Tissue transglutaminase on trophoblast cells as a possible target of autoantibodies contributing to pregnancy complications in celiac patients. *Am J Reprod Immunol* 2014

doi:10.1111/ajri.12290

Problem

Women with celiac disease (CD) are often affected by atypical presentations of the disease associated with reproductive disorders as a main extra-digestive complaint. Here, we analyzed if autoantibodies against tissue transglutaminase (tTG) in sera from CD patients with reproductive disorders could display direct effects through their interaction with tTG expressed on trophoblast cells and phagocytes inducing tissue damage and interfering in the clearance of trophoblast apoptotic bodies.

Method of study

Sera from CD women with reproductive disorders were obtained, and their ability to induce apoptosis of Swan-71 (cytotrophoblast cell line) and to modulate the wound-healing and phagocytes process was tested.

Results

Swan-71 cells expressed tTG and CD sera displayed a significant decrease in trophoblast cell migration and a delay in injury healing on trophoblast cells, compared with those observed with control sera. Moreover, CD sera significantly reduced trophoblast cell proliferation and increased apoptosis levels in comparison with those observed in the control sera. Finally, autoantibodies against tTG interfere in the clearance of trophoblast apoptotic bodies through a mechanism involving MFG-E8 (milk fat globulin-EGF factor 8)-tTG binding.

Conclusion

The anti-tTG antibodies might contribute to trophoblast damage and disrupt the phagocytosis process of apoptotic bodies that could promote a pro-inflammatory microenvironment.

Introduction

The constitution of the maternal-placental interface during decidualization and trophoblast invasion involves a pro-inflammatory response accompanied by a deeper tissue remodeling.^{1–3} The embryo has

to break through the epithelial lining of the uterus to implant, damaging the endometrial tissue to invade and replace the endothelium and vascular smooth muscle of the maternal blood vessels.^{4–6} In this sense, the inflammatory response that characterizes the peri-implantation period will be physiologically

limited by regulatory and tolerogenic mechanisms involving both innate and adaptative responses.^{7–9}

In this sense, leukocyte populations including T-cell subpopulations, uterine Natural killer cells, decidual macrophages and dendritic cells, as pro-implantatory mediators are collectively called BIEFs (blastocyst implantation essential factors) contribute to regulating this network.^{7–12}

In particular, macrophages constitute 20–30% of decidual immune cells, which are activated in an alternative pathway with wound-healing and tolerogenic abilities.^{13,14} In fact, apoptotic trophoblast, smooth muscle and endothelial cells will be efficiently removed by decidual macrophages to prevent a deleterious inflammatory response. Therefore, the immediate clearance of apoptotic cells induces an immunosuppressant/regulatory phenotype of decidual macrophages, producing IL-10 and TGF β .^{15,16} Accordingly, an exacerbate generation of apoptotic bodies and/or an ineffective clearance of them might contribute to a deregulation of inflammatory response during implantation and may be an underlying cause of pregnancy complication.¹⁷

Celiac disease is an autoimmune disorder triggered by gluten ingestion characterized by a complex clinical pattern that can involve several extra-digestive organs.¹⁸ Reproductive health can be affected in untreated celiac women, and sometimes gynecologic-obstetric complications are the only manifestation of disease^{19,20} including menstrual cycle disorders, low fertility, early miscarriages, preterm birth, intrauterine growth restriction and low birth-weight.^{21–26}

Patients with celiac disease display autoantibodies against tTG (tissue transglutaminase EC 2.3.2.13 or TG2), the specific autoantigen of CD and their detection is widely used as a diagnostic indicator.²⁷

tTG plays several biological functions in many tissues, some of them as tissue repair mediated by transamidating activity, while others are independent of its catalytic function.²⁸ At the cell surface, tTG is expressed in association with $\alpha_v\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ integrins acting as fibronectin co-receptors involved in cell adhesion and migration^{29,30} by promoting integrin clustering and cell signaling.³¹ In addition, the promotion of the clearance of dying cells is a novel function described for surface tTG expressed in murine^{32–34} and human macrophages.³⁵ Specifically, tTG binds MFG-E8 (milk fat globulin-EGF factor 8), a protein known to bridge β_3 integrins to apoptotic cells and mediate the uptake of dying cells.³³

tTG is present at the embryo–maternal interface,^{36–38} and in placenta, tTG plays a role in cross-linking fibronectin and supporting cell adhesion in association with the syncytiotrophoblast microvillous membrane³⁸ and stabilizes the particulate material shed from human placenta.³⁹

As tTG localizes at syncytiotrophoblast, the primary interface between maternal and fetal tissue is exposed to maternal blood and the autoantibodies against tTG developed during untreated disease could interfere with its biological functions. Data from our group and others^{40–43} suggest that these autoantibodies may have a pathogenic role in gynecologic-obstetric complaints.

Here, we analyzed if circulating autoantibodies against tTG from patients with CD could display direct effects through their interaction with surface tTG expressed on trophoblast cells inducing tissue damage and interfering in the clearance of trophoblast cells apoptotic bodies.

Materials and methods

Patients

Serum samples were obtained from 10 women with recently confirmed diagnoses of celiac disease and history of gynecologic-obstetric problems (infertility, early miscarriages and short breastfeeding) (mean: 33.4 years, age range: 29–47). All patients had small bowel biopsy-proven CD. All patients had anti-tTG IgA, while one of them also had IgG-specific antibodies. Nine serum samples were obtained from healthy non-pregnant women who had two or more previous normal pregnancies with no miscarriages (mean age 32.6 years, range 26–42 years) and used as control sera. All sera were stored at -20°C until use.

Patients were recruited from the Uruguayan Celiac Association and local hospital (Hospital Maciel); serum samples were used with permission from the Ethical Committee of the Faculty of Medicine, University of the Republic, Uruguay, and the informed consent of each participant was obtained.

Determination of anti-tTG Antibodies

Levels of tTG-specific IgA and IgG antibodies in sera from patients were determined by enzyme-linked immunosorbent assay using Quanta Lite[®] h-tTG IgA and Quanta Lite[®] h-tTG IgG ELISA according to the

manufacturer's instructions (INOVA Diagnostics, San Diego, CA, USA).

Immunostaining of Placental Tissue Sections

Sections of normal term placenta (kindly provided by Dr. G. Acosta) were dewaxed, rehydrated and boiled for 20 min in 10 mM sodium citrate, pH 6.0. Sections were pre-treated with normal goat serum and then incubated overnight at 4°C with serum samples from women with celiac disease or controls (dil. 1:50); 4E1 MAb (kindly provided by Dr. F. Chirido)⁴⁴ was used in parallel as a positive control (1:100). After washes, quenching of endogenous peroxidase activity was performed with 3% H₂O₂ in PBS for 20 min. Sections were then incubated for 1 h at room temperature with either goat anti-human IgA-horseradish peroxidase (HRP) or goat anti-mouse immunoglobulin-HRP (1:100). The reaction was developed with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride 10 mg/mL in TBS with 0.03% H₂O₂ for 15 min; slides were counterstained with Mayer's hematoxylin and mounted. For every assay, negative controls with no primary antibody were included.

Cell Lines

The trophoblast cell line Swan-71 (derived from telomerase-mediated transformation of a 7-week cytotrophoblast isolate described by Straszewski-Chavez⁴⁵) was cultured in complete Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 10% FBS (GibcoTM Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, USA). It was used to evaluate the antibodies effect on apoptosis, proliferation, migration and clearance of apoptotic cells.

The THP1 cell line was obtained from ATCC and maintained at 2×10^5 cells/mL in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS and 2 mM L-glutamine. THP1 cells (2×10^5 /mL) were differentiated using 100 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for 3 days. Then, PMA-containing media was removed, and cells were incubated for a further 5 days in fresh RPMI 1640 (10% FBS, 1% L-glutamine).

tTG Expression in Swan-71

Western blot analysis

Cell extracts from Swan-71 (obtained by lysis with 50 mM Tris-HCl, 0.1% Triton-X-100, 1 mM EDTA, 2-mercapto ethanol in the presence of proteinase inhibi-

tors) and guinea pig tissue transglutaminase were subjected to SDS-PAGE in 12% polyacrylamide gel. Proteins were then transferred to nitrocellulose which was subsequently blocked with 5% skimmed milk in PBS. Membranes were probed with human serum samples (dil. 1:1000 in PBS-1% BSA-0.05% Tween-20), or tTG-specific MAb (TG100, MS-RB-060-PCL, Thermo Fisher Scientific, Fremont CA, USA) diluted 1:4000 followed by incubation with appropriate dilutions of HRP-conjugated rabbit anti-human IgG (Dako, Denmark), HRP-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Thermo Fisher Scientific) or a secondary antibody alone as a negative control. Immunoblots were developed with the Super Signal chemiluminescence system (Pierce, Rockford, IL, USA).

Flow cytometry

Surface tTG expression in the Swan-71 cell line was analyzed by labeling it with tTG-specific MAb TG100 (1 µg/ 10^5 cells) and respective isotypic control followed by FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich).

To assess the binding of human tTG-specific antibodies from patients with celiac disease, cells were incubated with serum samples from women with celiac disease or controls (dil. 1:10 in 1% PBS-BSA) followed by FITC-conjugated anti-human IgA antibodies (1:100; Sigma-Aldrich).

Ten thousand events were acquired in a FACS Aria II cytometer[®], and results were analyzed using WinMDI 2.8 (free software <http://facs.scripps.edu/software.html>).

Scratch Assay

An injury was generated using a pipette tip in confluent Swan-71, cultures seeded over fibronectin, and wound healing was assessed by microscopy at different times (4, 8 and 24 h) in the presence of TG100 MAb (10 µg/mL), celiac or control sera (dil. 1:50).

Results were expressed as the ratio between the initial length of injury and the optimal incubation time for each experimental condition.

Migration Assays

Migration assays were performed with Swan-71 cells in transwell systems (BD Falcon cell culture inserts). Cells were seeded in 8-µm-pore inserts (25×10^4 cells/insert) which were then set in a 24-well plate

containing the DMEM medium with FBS 20% as chemo-attractant stimuli and were allowed to migrate in the absence or presence of the TG100 MAb (10 µg/mL), and after 24 and 48 h, the cell migration rate to the lower compartment was quantified by microscopy after DAPI staining of the insert membrane.

Proliferative Response

Swan-71 cells at 70% of confluence in a 96-well flat-bottom plate were cultured for 72 h in the presence of CD or control sera. Then, cells were pulsed for 18 h with 1 µCi/well of methyl- ^3H -thymidine [^3H]TdR (NEN, Boston, MA, USA). Trophoblast cells were then lysed and harvested on glass fiber filters using a Packard Filtermate cell harvester (Packard Instruments, LaGrange, IL, USA). Incorporated radioactivity was measured in a liquid scintillation β -counter (Packard Instruments). Tests were conducted in triplicate, and results were expressed as proliferation index (PI) defined as the ratio between mean cpm values for each experimental condition (CD or control serum) and control wells (culture medium).

Apoptosis Assay

Swan-71 basal apoptosis was induced by fetal bovine serum (FBS) deprivation, and the effect of antibodies on the apoptosis rate was evaluated in parallel with TG100 MAb (25 µg/mL) and sera dilutions from controls or women with celiac disease (1:20). After 24 h, apoptosis was assessed by double staining with FITC-labeled annexin-V and propidium iodide (PI) following the manufacturer's recommendations (Immunotech, Marseille, France). The apoptosis rate was defined as the percentage of apoptotic cells (annexin-V positive); results for each experimental condition were expressed as the fold increase in relation to basal condition (FBS deprivation).

Phagocytosis Assay

PMA differentiated THP-1 cells were used to study the effect of antibodies on the phagocytosis of apoptotic Swan-71 cells as a target. Swan-71 cells were labeled with CFSE, and apoptosis was induced with 4 µM camptothecin treatment for 12 h and controlled with IP/annexin-V staining as described above. Phagocytosis assays using differentiated

1×10^5 THP-1 cells and CFSE-stained apoptotic Swan-71 cells (ratio 1:1) were performed in the presence of TG100 MAb (10 µg/mL) and sera dilutions from controls or women with celiac disease (1:50) for 2 h at 37°C. As a phagocytosis control, co-cultures were performed at 4°C. Cells were stained with a phycoerythrin-conjugated anti-CD45 AcMo (BD Pharmingen), and the percentage of double-positive CD45-CFSE cells determined by flow cytometry was used as the percentage of THP-1 cells that ingested apoptotic cells.

Analysis of tTG–MFG-E8 Binding by ELISA

Microtiter plates (Maxisorb, Nunc) were incubated with 10 µg/mL solution of guinea pig tTG (Sigma-Aldrich) in PBS, overnight at 4°C. After blocking with 1% PBS-BSA, the wells were incubated with rabbit anti-tTG polyclonal antibody (RB-060-PCL; Thermo Fisher Scientific) at serial dilutions (1:500–1:2000) for 1 h at 37°C followed by incubation with recombinant human MFG-E8 (R&D Systems, MN, USA) in several concentrations (850–6250 pg/mL). Bound MFG-E8 was subsequently detected by specific MAb (MAB27671; R&D Systems, MN, USA). Finally, bound anti-MFG-E8 antibody was detected with HRP-conjugated goat anti-mouse diluted 1:5000 (Thermo Fisher Scientific) and developed with H_2O_2 -TMB substrate solution. Assays were performed in duplicate, and the media for each condition is indicated. Results are expressed as relative binding (%) in relation to the signal obtained without anti-tTG antibody.

Statistical Analysis

The Mann–Whitney test was applied to compare data from different groups, and the Spearman test was used to analyze the correlation between specific antibodies titers and each studied effect.

GraphPad Prism4 software (GraphPad, San Diego, CA, USA) was used and; significance was determined at $P < 0.05$.

Results

tTG is Expressed in Swan-71 Cells and in Term Placenta

In a first step, we evaluated tTG surface expression on Swan-71 cells, a cytotrophoblast cell line from

7 weeks of gestation, and in human term placental tissue. We could observe that reference MAb TG100 and celiac patient sera recognized tTG on Swan-71 detected by FACS analysis and also confirmed by Western blot. Fig. 1(a) shows a representative flow cytometry profile of tTG staining in Swan-71 cells by TG100 MAb and serum from a patient with celiac disease. Fig. 1(b) shows the immunoreactive band of tTG in the extract from trophoblast cells after incubation with TG100 MAb or CD serum. Moreover, when we evaluated tTG expression on term placental tissue by immunohistochemistry using the serum from a celiac woman with high anti-tTG IgA titers, we observed a strong staining of the syncytiotrophoblast surface with a similar pattern as that obtained with the anti-tTG MAb (4E1), characterized by a non-uniform mark distribution (Fig. 1c: ii and i, respectively).

Anti-tTG MAb and Celiac Women Sera Delayed Injury Healing and Migration

As the early implantation period is characterized by tissular remodeling and tTG contributes to injury healing, we investigated the effect of celiac sera on

injury healing and cell migration of trophoblast cells. Similar size wounds were introduced on monolayers of Swan-71 cell line incubated in the presence of sera from healthy or celiac women with gynecological complications. After 8 h, a measurable decrease of injury length was observed in all samples and as depicted in Fig. 2(a), sera from women with celiac disease displayed significantly delayed injury healing compared with control sera (* $P = 0.037$ Mann–Whitney test). Fig. 2(b) shows injury healing in the presence of a representative control serum, celiac serum or the TG100 MAb as a positive control.

To investigate whether the delayed injury healing observed in the presence of CD patient sera was caused by interference in the trophoblast cell migration due to anti-tTG antibodies, we performed migration assays using transwells system (pore 8 μm) with Swan-71 cells seeded in the upper compartment in the absence or presence of TG100 MAb; trophoblast cells were allowed to migrate to the lower compartment containing 20% FBS as chemo-attractant, and after 48 h, the trophoblast cells in lower compartment were quantified. We observed about a 15% decrease in the migration rate of trophoblast cells in

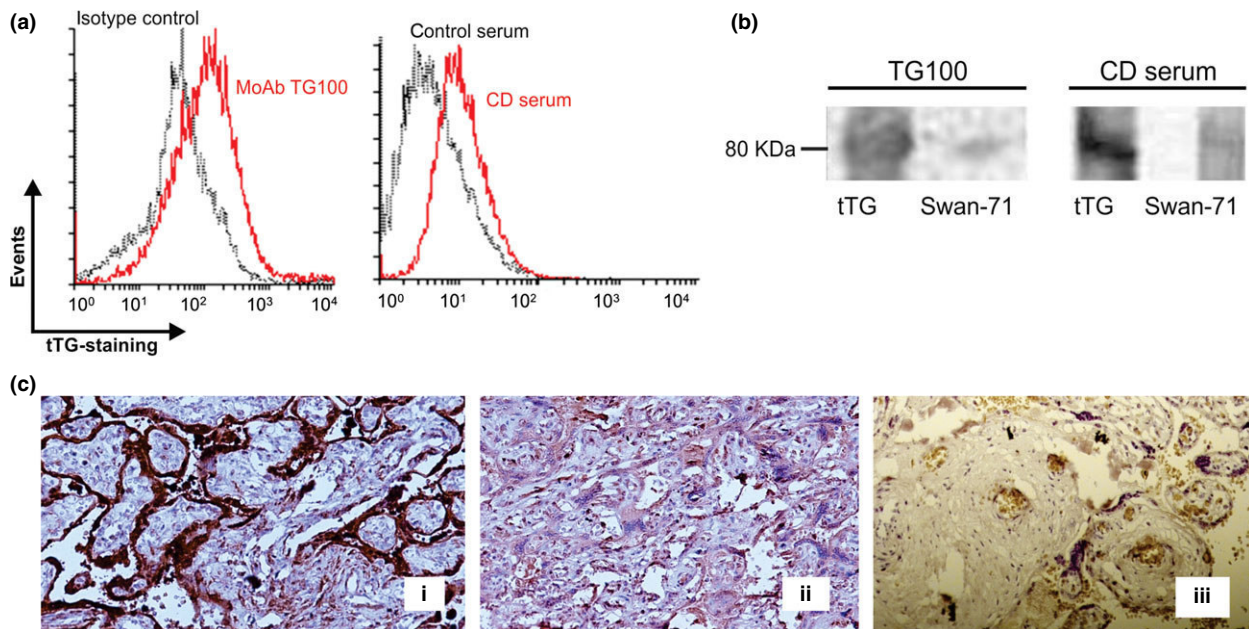


Fig. 1 Tissue transglutaminase (tTG) is expressed in Swan-71 cells and in term placenta. tTG expression on Swan-71 cells was evaluated by FACS analysis (a) and Western blot (b) with reference MAb TG100 and a representative CD serum sample. Immunohistochemical patterns of term placental tissue is shown at 200 $\times$ magnification (c). Reference anti-transglutaminase MAb (4E1) staining of syncytiotrophoblast is shown (i), serum from a celiac patient with history of obstetric problems showing binding of IgA at the syncytial surface (ii) and negative serum control (iii).

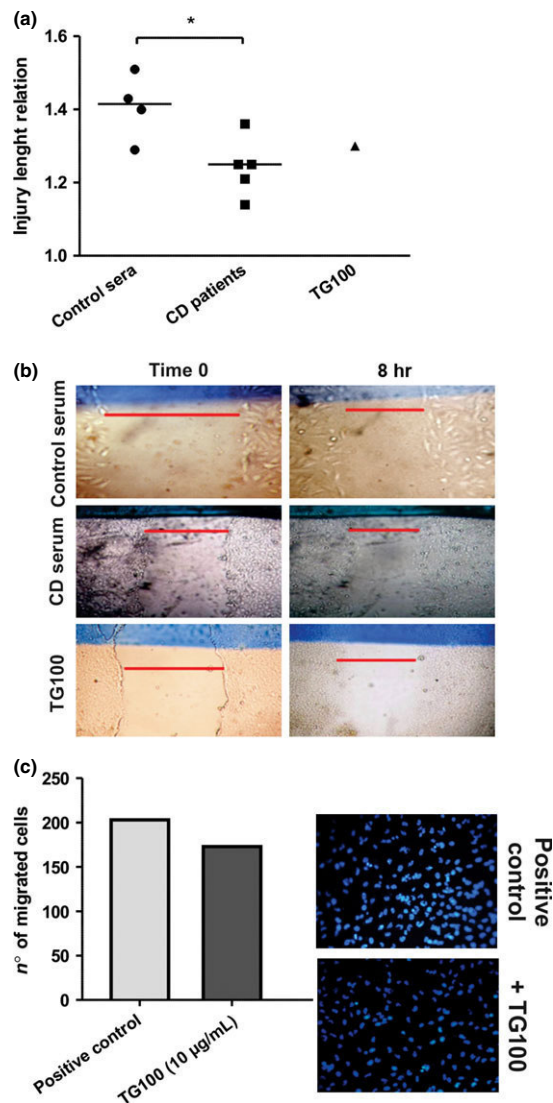


Fig. 2 Anti-tissue transglutaminase (tTG) MAb and celiac women sera delayed injury healing and migration of trophoblast cells. (a) Similar-sized wounds were introduced on monolayers of Swan-71 cells, and the length was measured initially and after 8 h. Results are expressed as the ratio between those measures in the presence of control sera, celiac patient sera (both dil. 1:50) and anti-tTG MAb (triplicate assay). Horizontal bars indicate medians ($*P = 0.037$ Mann–Whitney test). (b) Representative pictures of injury healing length after 8 h in the presence of a representative control serum, celiac serum or the TG100 MAb as a positive control (magnification 100 $\times$). (c) Migration assays were performed with Swan-71 cells in transwell systems. Cells were seeded in the upper compartment in the absence or presence of the TG100 MAb (10 $\mu\text{g/mL}$) using FBS 20% as chemo-attractant stimuli in the lower compartment. The left panel shows a quantitative analysis of trophoblast cell migration to the lower compartment in the absence or presence of TG100 MAb, and the right panel shows representative pictures of Swan-71 cells after 48 h of migration from one representative experiment (magnification 100 $\times$).

the presence of TG100 MAb (Fig. 2c, left panel), and representative pictures of Swan-71 cells after 48 h of migration in one representative experiment are shown in Fig. 2(c, right panel).

Celiac Sera Interfere in the Proliferation Rate and Promote Apoptosis of Trophoblast Cells

As cell surface tTG is a cue for survival and proliferation,²⁸ we investigated CD sera effects on trophoblast cells. Therefore, we quantified trophoblast cell proliferation in the presence of sera obtained from patients with CD or controls. As depicted in Fig. 3(a), sera from patients with CD significantly reduced the thymidine uptake in comparison with control sera ($*P = 0.004$, Mann–Whitney test).

Taking into account the lower proliferation levels of trophoblast cells in the presence of CD sera, we wondered if autoantibodies could affect their survival and promote apoptosis. Therefore, Swan-71 cells were cultured in the absence or presence of sera from patients with CD or controls, and we evaluated the apoptosis rate by annexin-V/PI staining after 24 h of starvation. We could observe that CD patient sera significantly increased the apoptosis levels in comparison with that observed for control sera with comparable protein content of each serum (fold increase median 1.7 for CD sera and 0.8 for controls; $*P = 0.011$ Mann–Whitney test) as shown in Fig. 3(b); in fact, the apoptotic levels observed with some CD sera were similar to those observed with TG100 MAb that induced a 2.7-fold increase of apoptotic cells in comparison with basal apoptosis. Interestingly, among CD sera analyzed, 6 of 8 correspond to women with previous miscarriages. Fig. 3(c) shows illustrative FITC annexin-V/PI dot plots of Swan-71 cells for each experimental condition.

tTG MAb Interfere in the Clearance of Apoptotic Trophoblast Cells Through a Mechanism Involving MFG-E8 Interaction

At the maternal–placental interface, the effective removal of apoptotic cells by phagocytes is an essential process which prevents the lysis and release of self-antigens and paternal alloantigens.^{2,4,5} Therefore, we evaluated whether the anti-tTG antibodies interfere in the phagocytosis process of trophoblast apoptotic bodies. For that purpose, we used the PMA-treated THP1 cell line that resemble macrophages in morphology and differentiation properties,⁴⁶ and we confirmed tTG expression by

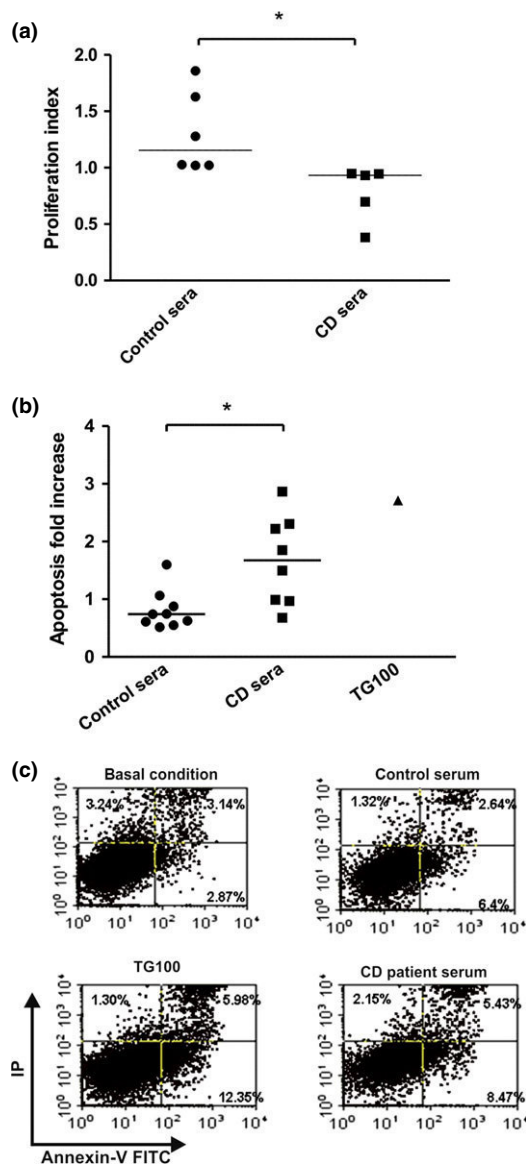


Fig. 3 Celiac sera interfere with the proliferation and induce apoptosis of trophoblast cells. (a) Swan-71 cells at 70% of confluence in a 96-well flat-bottom plate were cultured for 72 h in the presence of control or CD patient sera. Then, cells were pulsed for 18 h with [3 H]TdR, and incorporated radioactivity was measured (cpm). Tests were conducted in triplicate, and results were expressed as proliferation index (PI) defined as the ratio between mean cpm values for each experimental condition (CD or control serum) and control wells (culture medium). Horizontal bars indicate medians (* P = 0.004, Mann–Whitney test). (b) Swan-71 cells were cultured in the presence of control sera (n = 9), CD patient sera (n = 8) or TG100 MAb (triplicate assay) and the apoptosis levels quantified by IP/annexin-V staining. Results are expressed as the apoptosis fold increase. Horizontal bars indicate medians (* P = 0.011 Mann–Whitney test). (c) Illustrative dot plots of Swan-71 cells in the presence of control serum, CD serum or TG100 MAb.

flow cytometry (data not shown) as was previously reported.⁴⁷

For the phagocytosis assays, differentiated THP-1 cells were co-cultured with apoptotic Swan-71 bodies stained with CFSE as target in the presence or absence of CD patient sera, control sera or TG100 MAb. As depicted in Fig. 4(a), we observed a decrease in the percentage of CD45+CFSE+ cells in those cultures performed in the presence of CD patient sera in comparison with those performed with control sera. In fact, the TG100 MAb reduced the phagocytosis process in comparison with controls (median 23.2% versus 28.4%; TG100 21.4%). Fig. 4(a), lower panel shows illustrative dot plots of differentiated THP-1 cells after phagocytosis of CFSE apoptotic trophoblast bodies in the presence of CD serum, control serum or TG100 and a control of the phagocytosis process performed at 4°C.

As the present results suggest that antibodies against tTG disturb the phagocytosis process which is critical to maintaining immune homeostasis at the placental–maternal interface, we investigated a potential mechanism of interference. In this sense, MFG-E8 is the engulfment-related molecule best linked to clearance of apoptotic cells,^{33,48} and according to our results, it is also produced in significant amounts by differentiated THP-1 cells (0.4–1.0 ng/mL), and hence, we then investigated whether anti-tTG antibodies interfere with the interaction between tTG and MFG-E8. For that purpose, an ELISA was performed in which a rabbit anti-tTG polyclonal antibody in different dilutions was added to tTG-coated plates, and then, MFG-E8 (850 or 6250 pg/mL) was incorporated to assess whether the interaction between tTG and MFG-E8 could be disturbed by specific antibodies. As show in Fig. 4(b), anti-tTG antibodies significantly reduced the binding of MFG-E8–tTG in comparison with those assays performed in the absence of antibodies and the interference of MFG-E8 and tTG binding seems to be dose dependent, as an additional control MFG-E8 was added to determine the adherence to the plate in the absence of tTG.

Discussion

The presence of specific antibodies against tTG is a feature of celiac disease, while patients are not under a gluten-free diet. A pathogenic role of these autoantibodies on the reproductive health of women has been postulated because: (i) tTG participates in

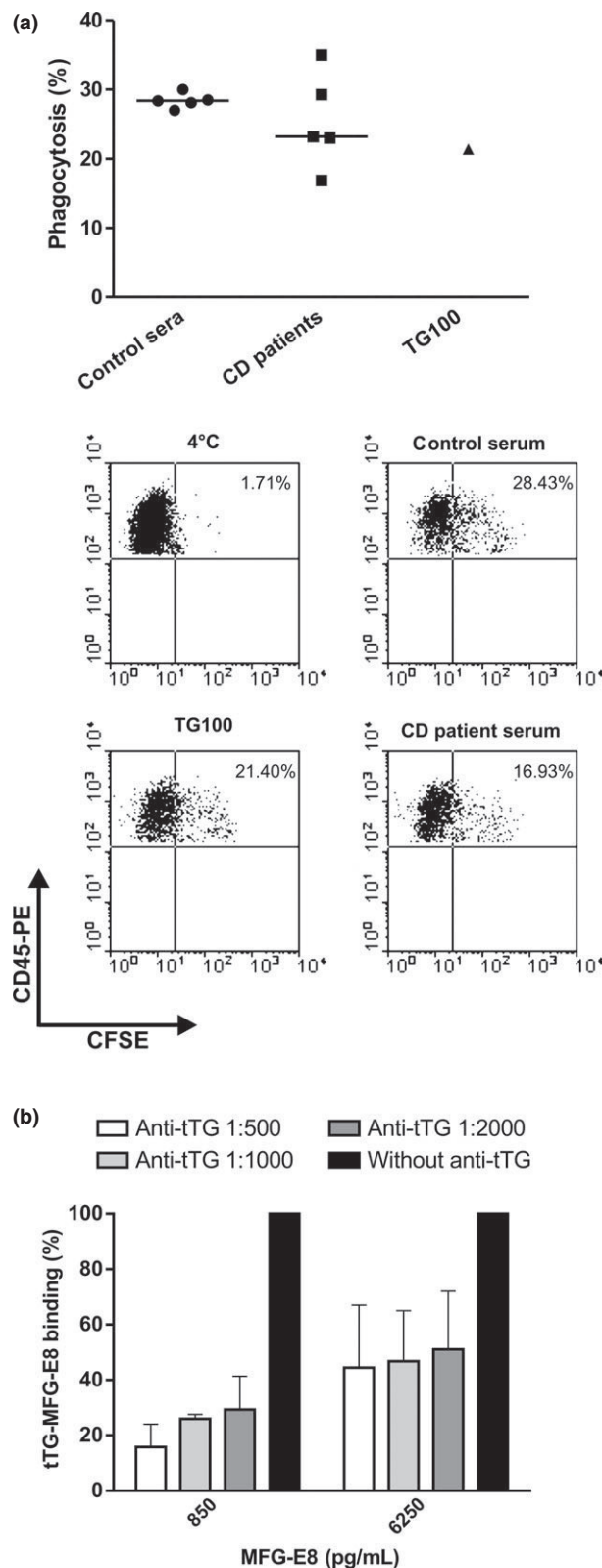


Fig. 4 Tissue transglutaminase (tTG) MAb interfere with the clearance of apoptotic trophoblast cells through a mechanism involving tTG–MFG-E8 interaction. (a) Phagocytosis assay. Differentiated THP-1 cells in the presence of PMA were co-cultured with apoptotic Swan-71 bodies CFSE-stained in the presence of control sera, CD patient sera or TG100 MAb (triplicate assay). The percentage of THP-1 cells that had phagocytosed apoptotic Swan-71 cells was determined by FACS analysis counting the frequency of CD45+CFSE+ cells. CD patient sera reduced the frequency of CD45+CFSE+ cells in comparison with control sera (median: 23.2% versus 28.4%; TG100 21.4%). The lower panel shows illustrative dot plots of differentiated THP-1 cells after phagocytosis of CFSE apoptotic trophoblast bodies in the presence of control serum, CD serum or TG100. (b) Anti-tTG antibodies effect on tTG–MFG-E8 interaction. Rabbit anti-tTG antibody at several dilutions (1:500; 1:1000 and 1:2000) was incubated in plate sensitized with tTG and MFG-E8 (850 or 6250 pg/mL). Results are expressed as relative binding (%) in relation to the signal obtained without anti-tTG antibody. Assays were conducted in duplicate, and results were expressed as mean + S.E.M.

endometrial physiological processes throughout the menstrual cycle, during decidualization and implantation³⁶ and controls several physiological processes that maintain tissue homeostasis^{49,50} and (ii) tTG expressed in placenta is accessible to circulating antibodies as the enzyme is exposed in the outer face of the syncytiotrophoblast microvillous membrane and cytotrophoblast.^{38,39,41}

In this sense, we have recently reported an association between gynecologic complications and anti-tTG antibodies titers in women with CD.⁴⁰ The aim of the present work is to study the effects of autoantibodies on several processes involved in implantation (survival, migration and proliferation of trophoblast cells) and homeostasis (clearance of apoptotic cells) that could be mediated by surface tTG. As tTG localizes to the syncytial microvillous surface of human placenta,³⁸ we used Swan-71 cells as a model and for the first time describe the expression of tTG on these trophoblastic cells using a commercial MAb and show that it can be the target of antibodies in the sera from celiac women with a history of obstetric complaints (Fig. 1).

During the peri-implantation period, the trophoblast invasive capacity depends on their ability to proliferate and migrate, here we could observe that anti-tTG reduces the proliferation and migration of trophoblast reflected by a delay in the closing of the gap injury (Fig. 2). In fact, sera from patients with CD could directly affect trophoblast survival, not only reducing their proliferation rate, but even promoting their apoptosis (Fig. 3). These data are in line with previous work performed with primary cells

isolated from term placenta,⁴² but our work focuses on a first trimester trophoblast cell model and further explores the consequences of the accumulation of apoptotic trophoblasts.

Under normal conditions, apoptotic cells are quickly removed by maternal macrophages at early stages of pregnancy. The phagocytosis of the apoptotic cells elicits the release of anti-inflammatory mediators such as IL-10, TGF β and prostaglandins *in vitro*^{13–15}; moreover, this recognition actively suppresses inflammatory cytokine release *in vitro*.⁵¹

Therefore, the inefficient clearance of exacerbated apoptotic trophoblast cells could promote a deregulation in the maternal immune response at the maternal–placental interface conditioning the immunosuppressive effects. As a consequence, inflammation is often observed at the maternal–fetal interface as the final pathological assault in many cases of pregnancy losses, including those of unexplained etiologies.^{4,52} In a previous work, we observed that PBMCs obtained from patients with recurrent pregnancy loss with immunological causes displayed an exacerbated pro-inflammatory and Th1 immune response after the interaction with Swan-71 cells, reflected by an increase in T-bet expression level and nitrite production while decreasing TGF β and IL-10 production⁵².

In addition, increased rates of apoptosis and inflammation were described in placenta from untreated celiac patients with low birthweight babies.⁵³

In this context, we hypothesize that tTG expressed on the surface of phagocytes in the maternal–fetal interface can also be targeted by autoantibodies on the basis of the novel role of tTG on the clearance of apoptotic cells³³ and evidence from tTG knockout mice that revealed that the phagocytic capacity of tTG-null macrophages to engulf apoptotic cells is impaired.^{32,34} In addition, we recently reported that the anti-tTG antibody spontaneously produced by the non-obese diabetic (NOD) mouse model inhibited apoptotic cell phagocytosis by peritoneal macrophages from pregnant NOD mice that express tTG on surface. Evidence provided supports a role for anti-tTG antibodies through reduced transamidating activity and reduced apoptotic cell clearance by pregnant NOD mice macrophages.⁵⁴

We used PMA-treated THP-1 as a cell model for maternal macrophages and observed an average 18% reduction in the phagocytosis rates in the presence of serum samples from women with

celiac disease in relation to sera from healthy women.

No significant correlation was observed among tTG-specific antibody titers and any of the cell functions evaluated (healing, proliferation, migration and phagocytosis); this lack of correlation can be attributable to differences in the fine specificity repertoire of antibodies among patients as tTG-specific antibodies are evolved against different functional domains of the enzyme, and each subsets of autoantibodies could differentially contribute to pathology.^{55,56}

To further explore the molecular mechanism putatively involved in phagocytosis impairment, we focused on the role of tTG in establishing a link with MFG-E8 on the cell surface.³³ We first verified the presence of MFG-E8 in cultures derived from THP-1 cells, as MFG-E8 is one of the best studied engulfment-related molecules.⁴⁸ As a first approach, we explored the ability of anti-tTG antibodies to interfere with the tTG and MFG-E8 binding which could result in a decrease in the phagocytosis of the apoptotic trophoblast cells; our results show that this mechanism could be involved as the interaction between tTG and MFG-E8 was decreased in the presence of the rabbit anti-tTG polyclonal antibody. Further work is currently underway to decipher if this molecular mechanism can take place at the cellular level in the presence of specific antibodies elicited during celiac disease.

Results presented herein provide experimental evidence that the autoantibodies against tTG could promote the apoptosis of trophoblast cells, delay injury healing and interfere in the clearance of trophoblast apoptotic bodies through a mechanism putatively involving MFG-E8 interaction. The present evidence not only shows that anti-tTG autoantibodies contribute to trophoblast direct tissue damage, but they could also disrupt apoptotic trophoblast cell phagocytosis promoting a pro-inflammatory microenvironment characterized as in adverse pregnancy and obstetric outcomes.

Acknowledgements

This study was supported by grants from RR (CONICET PIP 2659, UBACyT 2010-2012), CPL (UBACyT 2011-2014 and PICT 2011-0144 from ANPCyT) and CS/AH (CSIC ID 1713). It was also partially supported by PEDECIBA, ANII and ESCALA Program (AUGM). We thank Dr. Gil Mor who kindly gave us the Swan-71 cell line. The authors thank the

Uruguayan Celiac Association (ACELU) and Dr E. Trucco, Dr C. Servetto and F. Antúnez (Hospital Maciel) for their invaluable collaboration. Authors are grateful to Susan Holming for the English revision of the manuscript.

References

- Mor G: Inflammation and pregnancy: the role of toll-like receptors in trophoblast-immune interaction. *Ann NY Acad Sci* 2008; 1127:121–128.
- Dekel N, Gnainsky Y, Granot I, Mor G: Inflammation and implantation. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63:17–21.
- Abrahams VM, Visintin I, Aldo PB, Guller S, Romero R, Mor G: A role for TLRs in the regulation of immune cell migration by first trimester trophoblast cells. *J Immunol* 2005; 175:8096–8104.
- Weiss G, Goldsmith LT, Taylor RN, Bellet D, Taylor HS: Inflammation in reproductive disorders. *Reprod Sci* 2009; 16: 216–229.
- Warning JC, McCracken SA, Morris JM: A balancing act: mechanisms by which the fetus avoids rejection by the maternal immune system. *Reproduction* 2011; 141:715–724.
- Mor G, Cardenas I: The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63:425–433.
- Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG: Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol* 2004; 5:266–271.
- Guerin LR, Prins JR, Robertson SA: Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? *Hum Reprod Update* 2009; 15:517–535.
- Terness P, Kallikourdis M, Betz AG, Rabinovich GA, Saito S, Clark DA: Tolerance signaling molecules and pregnancy: IDO, galectins, and the renaissance of regulatory T cells. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58:238–254.
- Leber A, Teles A, Zenclussen AC: Regulatory T cells and their role in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63:445–459.
- Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M: Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63:601–610.
- Ramhorst R, Fraccaroli L, Aldo P, Alvero AB, Cardenas I, Leiros CP, Mor G: Modulation and recruitment of inducible regulatory T cells by first trimester trophoblast cells. *Am J Reprod Immunol* 2012; 67:17–27.
- Nagamatsu T, Schust DJ: The contribution of macrophages to normal and pathological pregnancies. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63:460–471.
- Ambarus CA, Krausz S, van Eijk M, Hamann J, Radstake TR, Reedquist KA, Tak PP, Baeten DL: Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages. *J Immunol Methods* 2012; 375:196–206.
- Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M: Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol* 2013; 229:176–185.
- Fest S, Aldo PB, Abrahams VM, Visintin I, Alvero A, Chen R, Chavez SL, Romero R, Mor G: Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory network for the protection of pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2007; 57:55–66.
- Abrahams VM, Kim YM, Straszewski SL, Romero R, Mor G: Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2004; 51:275–282.
- Alaedini A, Green PH: Narrative review: celiac disease: understanding a complex autoimmune disorder. *Ann Intern Med* 2005; 142:289–298.
- Ozgor B, Selimoglu MA: Coeliac disease and reproductive disorders. *Scand J Gastroenterol* 2010; 45:395–402.
- Soni S, Badawy SZ: Celiac disease and its effect on human reproduction: a review. *J Reprod Med* 2010; 55:3–8.
- Khashan AS, Henriksen TB, Mortensen PB, McNamee R, McCarthy FP, Pedersen MG, Kenny LC: The impact of maternal celiac disease on birthweight and preterm birth: a Danish population-based cohort study. *Hum Reprod* 2010; 25:528–534.
- Ludvigsson JF, Montgomery SM, Ekblom A: Celiac disease and risk of adverse fetal outcome: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 2005; 129:454–463.
- Ciacchi C, Cirillo M, Auriemma G, Di Dato G, Sabbatini F, Mazzacca G: Celiac disease and pregnancy outcome. *Am J Gastroenterol* 1996; 91:718–722.
- Gasbarrini A, Torre ES, Trivellini C, De Carolis S, Caruso A, Gasbarrini G: Recurrent spontaneous abortion and intrauterine fetal growth retardation as symptoms of coeliac disease. *Lancet* 2000; 356:399–400.
- Smecuol E, Maurino E, Vazquez H, Pedreira S, Niveloni S, Mazure R, Boerr L, Bai JC: Gynaecological and obstetric disorders in coeliac disease: frequent clinical onset during pregnancy or the puerperium. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996; 8:63–69.
- Tata LJ, Card TR, Logan RF, Hubbard RB, Smith CJ, West J: Fertility and pregnancy-related events in women with celiac disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* 2005; 128:849–855.
- Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D: Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 1997; 3:797–801.
- Gundemir S, Colak G, Tucholski J, Johnson GV: Transglutaminase 2: a molecular Swiss army knife. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1823:406–419.
- Akimov SS, Krylov D, Fleischman LF, Belkin AM: Tissue transglutaminase is an integrin-binding adhesion coreceptor for fibronectin. *J Cell Biol* 2000; 148:825–838.
- Akimov SS, Belkin AM: Cell surface tissue transglutaminase is involved in adhesion and migration of monocytic cells on fibronectin. *Blood* 2001; 98:1567–1576.
- Janiak A, Zemskov EA, Belkin AM: Cell surface transglutaminase promotes RhoA activation via integrin clustering and suppression of the Src-p190RhoGAP signaling pathway. *Mol Biol Cell* 2006; 17:1606–1619.
- Falasca L, Iadevaia V, Ciccocioppo F, Melino G, Serafino A, Piacentini M: Transglutaminase type II is a key element in the regulation of the anti-inflammatory response elicited by apoptotic cell engulfment. *J Immunol* 2005; 174:7330–7340.
- Toth B, Garabuczi E, Sarang Z, Vereb G, Vamosi G, Aeschlimann D, Blasko B, Becsi B, Erdodi F, Lacy-Hulbert A, Zhang A, Falasca L, Birge RB, Balajthy Z, Melino G, Fesus L, Szondy Z: Transglutaminase 2 is needed for the formation of an efficient phagocyte portal in macrophages engulfing apoptotic cells. *J Immunol* 2009; 182: 2084–2092.
- Szondy Z, Sarang Z, Molnar P, Nemeth T, Piacentini M, Mastroberardino PG, Falasca L, Aeschlimann D, Kovacs J, Kiss I, Szegezdi E, Lakos G, Rajnavolgyi E, Birkbichler PJ, Melino G, Fesus L: Transglutaminase 2–/– mice reveal a phagocytosis-associated crosstalk between macrophages and apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:7812–7817.

- 35 Rebe C, Raveneau M, Chevriaux A, Lakomy D, Sberna AL, Costa A, Bessede G, Athias A, Steinmetz E, Lobaccaro JM, Alves G, Menicacci A, Vachenc S, Solary E, Gambert P, Masson D: Induction of transglutaminase 2 by a liver X receptor/retinoic acid receptor alpha pathway increases the clearance of apoptotic cells by human macrophages. *Circ Res* 2009; 105:393–401.
- 36 Kabir-Salmani M, Shiokawa S, Akimoto Y, Sakai K, Iwashita M: Tissue transglutaminase at embryo-maternal interface. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:4694–4702.
- 37 Hager H, Gliemann J, Hamilton-Dutoit S, Ebbesen P, Koppelhus U, Jensen PH: Developmental regulation of tissue transglutaminase during human placentation and expression in neoplastic trophoblast. *J Pathol* 1997; 181:106–110.
- 38 Robinson NJ, Glazier JD, Greenwood SL, Baker PN, Aplin JD: Tissue transglutaminase expression and activity in placenta. *Placenta* 2006; 27:148–157.
- 39 Robinson NJ, Baker PN, Jones CJ, Aplin JD: A role for tissue transglutaminase in stabilization of membrane-cytoskeletal particles shed from the human placenta. *Biol Reprod* 2007; 77:648–657.
- 40 Sonora C, Munoz F, Del Rio N, Acosta G, Montenegro C, Trucco E, Hernandez A: Celiac disease and gynecologic complications: can serum antibodies modulate tissue transglutaminase functions and contribute to clinical pattern? *Am J Reprod Immunol* 2011; 66:476–487.
- 41 Anjum N, Baker PN, Robinson NJ, Aplin JD: Maternal celiac disease autoantibodies bind directly to syncytiotrophoblast and inhibit placental tissue transglutaminase activity. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7:16.
- 42 Di Simone N, Silano M, Castellani R, Di Nicuolo F, D'Alessio MC, Franceschi F, Tritarelli A, Leone AM, Tersigni C, Gasbarrini G, Silveri NG, Caruso A, Gasbarrini A: Anti-tissue transglutaminase antibodies from celiac patients are responsible for trophoblast damage via apoptosis in vitro. *Am J Gastroenterol* 2010; 105:2254–2261.
- 43 Di Simone N, De Spirito M, Di Nicuolo F, Tersigni C, Castellani R, Silano M, Maulucci G, Papi M, Marana R, Scambia G, Gasbarrini A: Potential new mechanisms of placental damage in celiac disease: anti-transglutaminase antibodies impair human endometrial angiogenesis. *Biol Reprod* 2013; 89:88.
- 44 Di Niro R, Ferrara F, Not T, Bradbury AR, Chirido F, Marzari R, Sblattero D: Characterizing monoclonal antibody epitopes by filtered gene fragment phage display. *Biochem J* 2005; 388:889–894.
- 45 Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Alvero AB, Aldo PB, Ma Y, Guller S, Romero R, Mor G: The isolation and characterization of a novel telomerase immortalized first trimester trophoblast cell line, Swan 71. *Placenta* 2009; 30:939–948.
- 46 Aldo PB, Craveiro V, Guller S, Mor G: Effect of culture conditions on the phenotype of THP-1 monocyte cell line. *Am J Reprod Immunol* 2013; 70:80–86.
- 47 Mehta K, Lopez-Berestein G: Expression of tissue transglutaminase in cultured monocytic leukemia (THP-1) cells during differentiation. *Cancer Res* 1986; 46:1388–1394.
- 48 Fuller AD, Van Eldik LJ: MFG-E8 regulates microglial phagocytosis of apoptotic neurons. *J Neuroimmune Pharmacol* 2008; 3:246–256.
- 49 Fesus L, Piacentini M: Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends Biochem Sci* 2002; 27:534–539.
- 50 Rossin F, D'Eletto M, Macdonald D, Farrace MG, Piacentini M: TG2 transamidating activity acts as a reostat controlling the interplay between apoptosis and autophagy. *Amino Acids* 2012; 42:1793–1802.
- 51 Elliott MR, Ravichandran KS: Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *J Cell Biol* 2010; 189:1059–1070.
- 52 Fraccaroli L, Grasso E, Hauk V, Cortelezzi M, Calo G, Perez Leiros C, Ramhorst R: Defects in the vasoactive intestinal peptide (VIP)/VPAC system during early stages of the placental-maternal leucocyte interaction impair the maternal tolerogenic response. *Clin Exp Immunol* 2012; 170:310–320.
- 53 Hadziselimovic F, Geneto R, Buser M: Celiac disease, pregnancy, small for gestational age: role of extravillous trophoblast. *Fetal Pediatr Pathol* 2007; 26:125–134.
- 54 Sonora C, Mourglia-Ettlin G, Calo G, Hauk V, Ramhorst R, Hernandez A, Leiros CP: Anti-tissue transglutaminase antibody inhibits apoptotic cell clearance by macrophages in pregnant NOD mice. *J Reprod Immunol* 2014; 103:59–66.
- 55 Seissler J, Wohlrab U, Wuensche C, Scherbaum WA, Boehm BO: Autoantibodies from patients with coeliac disease recognize distinct functional domains of the autoantigen tissue transglutaminase. *Clin Exp Immunol* 2001; 125:216–221.
- 56 Sblattero D, Florian F, Azzoni E, Zyla T, Park M, Baldas V, Not T, Ventura A, Bradbury A, Marzari R: The analysis of the fine specificity of celiac disease antibodies using tissue transglutaminase fragments. *Eur J Biochem* 2002; 269:5175–5181.

Los anti-tTG producidos durante la preñez en un modelo de autoinmunidad: efectos sobre la función de los macrófagos

En este capítulo se describen los resultados obtenidos en relación al tercer objetivo del trabajo, vinculados a estudiar en un modelo animal en condiciones de preñez la posible implicancia de la tTG en los problemas reproductivos en presencia de anticuerpos específicos.

Para ello y utilizando material biológico derivado de ratones NOD (obtenido por integrantes del laboratorio de Inmunofarmacología de FCEyN, UBA) hemos realizado trabajo experimental que complementa y apoya algunos de los resultados obtenidos previamente utilizando las líneas celulares humanas y que permitiría avanzar en la exploración de los mecanismos implicados en los efectos provocados por los anticuerpos anti-tTG en la interfase materno fetal.

Los resultados están contenidos en la publicación adjunta (Art.3):

"Anti-tissue transglutaminase antibody inhibits apoptotic cell clearance by macrophages in pregnant NOD mice".

Sóñora C, Mourglia-Ettlin G, Calo G, Hauk V, Ramhorst R, Hernández A, Leirós CP. *J Reprod Immunol* 2014; 103: 59–66.

A continuación se resumen los antecedentes específicos, los principales hallazgos y sus implicancias.

Existen varios estudios sobre las funciones de la tTG en modelos animales y a los efectos de estudiar las funciones *in vivo* de esta enzima han sido clave los modelos de ratones knockout (KO, tTG -/-) para tTG desarrollados por dos grupos de investigación (De Laurenzi and Melino 2001; Nanda, Iismaa et al. 2001).

Originalmente estos animales se describieron como viables, con un crecimiento normal en tamaño y peso y sin anomalías aparentes en las funciones orgánicas, no existiendo estudios sistemáticos sobre la tasa de abortos espontáneos, el tamaño de las camadas u otros aspectos vinculados con la reproducción.

Al empezar a estudiar estos ratones en mayor profundidad, en los últimos años comenzaron a detectarse varias alteraciones que se vinculan directa o indirectamente con la enzima.

En particular, la pérdida de la expresión de la tTG *in vivo* resulta en una fagocitosis inadecuada de células apoptóticas que puede propiciar la autoinmunidad (Szondy, Sarang et al. 2003), esta afectación se ve a nivel de los macrófagos donde la tTG, como se ha comentado previamente, actúa como co-receptor para la integrina $\beta 3$, interactuando con ella y su ligando en el proceso de fagocitosis, MFG-E8 (Toth, Garabuczi et al. 2009).

Mientras que en los macrófagos tTG +/+ la integrina $\beta 3$, al igual que otros receptores fagocíticos, se encuentra concentrada fundamentalmente a nivel de la copa fagocítica, en ausencia de tTG esta se distribuye en forma homogénea por la superficie celular y la señalización celular mediada por su interacción con la célula apoptótica, que lleva a la activación de RhoG and Rac1, se ve afectada (Figura 13). Los macrófagos tTG -/- compensan la pérdida de la enzima aumentando la expresión de la integrina $\beta 3$ y RhoG para potenciar la señalización dependiente de la primera en ausencia de la tTG.

En condiciones normales los macrófagos usan uno o dos portales fagocíticos para captar las células apoptóticas, la pérdida de la tTG no afecta el número de estos portales, pero si se ha observado que tanto la formación como la tasa de fagocitosis de los mismos es menos eficiente, por lo que se ha propuesto que la tTG es clave en la estabilización de los portales fagocíticos (Toth, Garabuczi et al. 2009).

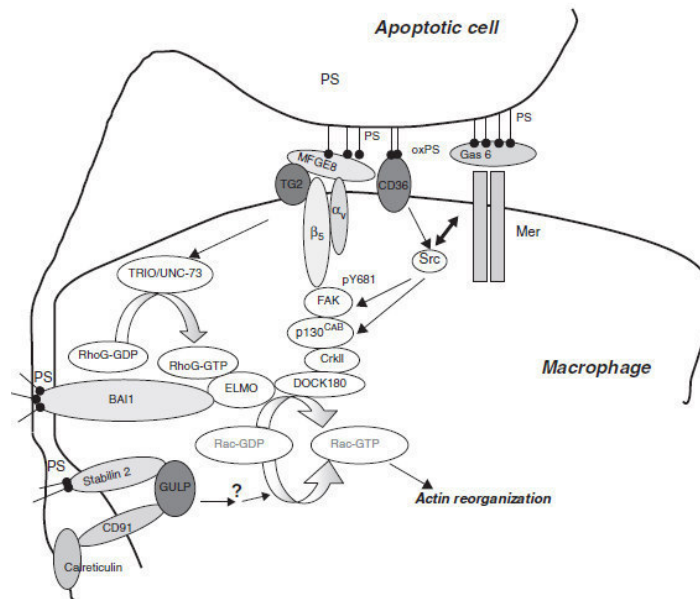


Figura 13. Vías de señalización intracelular involucradas en la captación de células apoptóticas.

Se muestra a la tTG (TG2) extracelular interactuando con integrinas y MFG-E8.

Tomado de *Transglutaminase 2 dysfunctions in the development of autoimmune disorders: celiac disease and tTG-/- mouse* (Szondy, Korponay-Szabo et al. 2011)

En relación a la EC, no se dispone de modelos que reproduzcan todas las características de la enfermedad como ser la atrofia vellositaria y la presencia de anti-tTG circulantes pero se ha reportado que la administración exógena en ratones de estos autoanticuerpos (provenientes de pacientes celíacos) provoca que los mismos sean reclutados a nivel del sistema nervioso central generando ataxia (Boscolo, Lorenzon et al. 2010) que representa la principal manifestación neurológica de la EC.

Por otra parte, el proceso de angiogénesis se ha inhibido mediante la administración local de anticuerpos anti-tTG (Kalliokoski, Sulic et al. 2013).

En esta misma línea, recientemente se ha observado que la administración intra-peritoneal de suero ó IgG anti-tTG provenientes de pacientes celíacos en ratones atímicos induce un cuadro gastrointestinal con depósito de anticuerpos en intestino y alteraciones de la arquitectura de la mucosa intestinal característica

de los estados tempranos de la EC. Además, se detectó depósito de los anticuerpos en varios tejidos periféricos (Kallioikoski, Caja et al. 2015).

Estos resultados son consistentes con estudios retrospectivos en humanos que describen que el depósito de los anti-tTG a nivel del intestino precede y predice la atrofia vellositaria (Salmi, Collin et al. 2006), sugiriendo su implicancia en el inicio de la lesión.

En este contexto consideramos que podría resultar de utilidad el modelo de ratones NOD (diabético no obeso) (Leiter 2001; Wicker, Clark et al. 2005) dado que producen espontáneamente anticuerpos anti-tTG de origen principalmente intestinal, de isotipos IgG e IgA y generados en forma independiente al consumo de glúten los que están ausentes en la cepa de ratones BALB/c considerada como referencia por el background genético (Sblattero, Maurano et al. 2005).

Estos animales desarrollan desórdenes autoinmunes espontáneamente a partir de la semana 12 de vida constituyendo un modelo útil para estudiar las anormalidades inmunorreguladoras que llevan a la destrucción celular por mecanismos autoinmunes y a la diabetes mellitus tipo I o insulino dependiente (Wicker, Clark et al. 2005). La pérdida de tolerancia en el compartimento de células B es uno de los primeros indicadores de la aparición del proceso autoinmune (Yu, Robles et al. 2000) observándose un repertorio activo de autoanticuerpos ya a la cuarta semana de vida (Thomas, Kendall et al. 2002).

Interesantemente, se han descrito signos de problemas en la gestación en los ratones NOD tanto en el estadio pre-diabético como en el diabético y se ha detectado una disminución en el tamaño de las camadas y un aumento en la tasa de resorción embrionaria asociadas clásicamente con una actividad defectuosa de los Linfocitos T reguladores y las Natural Killers a nivel local (Burke, Dong et al. 2007; Roca, Calafat et al. 2009; Toth, Sarang et al. 2009) sin embargo la asociación entre estos autoanticuerpos y las complicaciones reproductivas observadas en estos animales hasta ahora no ha sido reportada.

En el estadio pre-diabético presentan varias características del síndrome de Sjögren (Delaleu, Nguyen et al. 2011) seguido del desenlace de la diabetes tipo 1 (después de la semana 20).

La diabetes tipo 1 y la Enfermedad de Sjögren representan dos de las patologías autoinmunes más frecuentemente vinculadas a la enfermedad celíaca; la diabetes tiene una incidencia en la población celíaca entre 10 y 30 veces mayor que en la población general (Briani, Samaroo et al. 2008) y ambas comparten una fuerte asociación genética con uno de los alelos de moléculas de MHC-II (DQ8).

Interesantemente la tTG se ha asociado con las alteraciones en los mecanismos homeostáticos celulares en ambas condiciones, el síndrome de Sjögren y la diabetes mellitus tipo I (Di Sabatino, Vanoli et al. 2012).

Se ha reportado que individuos con diabetes tipo 1 con una dieta libre de glúten pueden tener una mejoría clínica y que algunos individuos diabéticos con histología intestinal normal presentan anticuerpos anti-tTG circulantes, incluso algunos de ellos presentan depósitos de los mismos en el intestino delgado sugiriendo que la diabetes tipo 1 precede a la EC en estos casos (Maglio, Florian et al. 2009).

Por otra parte, las mujeres con diabetes tipo1 presentan también frecuentemente complicaciones en el embarazo (Yang, Cummings et al. 2006).

La conjunción de todos estos aspectos nos condujeron a pensar que los ratones NOD en la etapa pre-diabética pueden representar una aproximación experimental útil para analizar el rol de los anticuerpos anti-tTG en los procesos de implantación.

Además, dado que todavía no se ha estudiado si existe un rol directo de los anticuerpos anti-tTG sobre la función fagocítica de los macrófagos de los ratones NOD y puesto que la fagocitosis de células apoptóticas es una de las funciones centrales de los macrófagos durante las etapas tempranas de la gestación, en esta parte del trabajo nos propusimos caracterizar en mayor profundidad la presencia de anticuerpos anti-tTG en los sueros de los ratones NOD hembra y su capacidad de interferir con las diferentes actividades de la enzima que puedan ser relevantes en el proceso de implantación embrionaria focalizándonos en el proceso de fagocitosis de células apoptóticas por parte de los macrófagos de hembras NOD preñadas.

4.1 Los anticuerpos anti-tTG presentes en el suero de ratones NOD inhiben la actividad de transamidación de la enzima.

En primera instancia analizamos los niveles de anticuerpos anti-tTG de isotipo IgA e IgG en hembras NOD en estadio pre-diabético, con ciclos normales y con 9 días de gestación.

No detectamos IgA anti-tTG en ninguno de los grupos de animales estudiados pero nuestros resultados, obtenidos mediante técnicas de ELISA, mostraron que los sueros de las hembras NOD no preñadas poseen una concentración de IgG anti-tTG significativamente más alta que la de los sueros de las BALB/c de la misma edad y condición como se muestra en la Figura 1A (Art.3).

Por otra parte no se observaron diferencias significativas en el contenido total de IgG entre ambos grupos de animales (Figura 1B, Art.3).

Al comparar los niveles de IgG anti-tTG de las hembras NOD preñadas y no preñadas observamos menores niveles de los mismos en las gestantes (Figura 1A, Art.3) mientras que no se detectaron diferencias entre las concentraciones totales de IgG (Figura 1B). Estos hechos sugieren que los anti-tTG podrían ser retenidos en el útero gestante.

A continuación analizamos *in vitro* el efecto de los sueros de las hembras NOD, conteniendo anticuerpos específicos anti-tTG, en la actividad de transamidación de la enzima dado que dicha actividad es necesaria para muchos procesos como ser la remodelación de la MEC (Belkin 2011) y la incorporación de TGF- β 1 a ésta última para ser activado (Verderio, Gaudry et al. 1999).

Como se puede observar en la Figura 1C (Art.3) la presencia de algunos de los sueros procedentes de los animales NOD disminuyen la actividad de transamidación con un rango de inhibición que va de desde el 23 al 54% con respecto a la actividad basal mientras que los sueros de las hembras BALB/c o no modificaron la actividad enzimática o incluso en algunos casos la aumentaron. Se usó como control de inhibición monodansyl cadaverina, inhibidor competitivo

específico de la enzima, el cuál disminuyó la actividad a un 70% de la observada en condiciones basales.

No se pudo establecer correlación estadísticamente significativa entre el efecto de los sueros sobre la actividad enzimática y la concentración de IgG anti-tTG de los mismos.

4.2 Los anticuerpos anti-tTG reconocen estructuras del útero gestante.

Basándonos en la observación de que en las hembras NOD disminuía la concentración en suero de anticuerpos anti-tTG al día 9 de gestación en comparación con lo observado en los animales no preñados, nos planteamos como hipótesis que esto podía deberse a que parte de esos anticuerpos pudieran ser captados, por interacción con su antígeno específico, a nivel de los tejidos de la interfase materno-fetal.

Para verificar la factibilidad de esta hipótesis analizamos por técnicas de inmunohistoquímica si las estructuras de dicha interfase pueden ser reconocidas en forma específica por anticuerpos anti-tTG; para ello se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-tTG, 2G3 improntas conteniendo cortes de sitios de implantación viables del día 9 de gestación de ratones NOD. Este AcMo se une a un epítipo de la tTG humana localizado en la región del core catalítico (aa 314-329) siendo capaz de reconocer también la tTG de ratón.

En las Figuras 2A y 2B (Art.3) se muestra el marcado específico con el AcMo 2G3 de las células epiteliales, particularmente en las glándulas uterinas, y también a nivel de células de estroma. No se observó señal alguna cuando se utilizaron sueros procedentes de BALB/c como control (Figura 2C, Art. 3) y una señal débil cuando se utilizaron los sueros de las hembras NOD.

4.3 La tTG se expresa en la superficie de los macrófagos y su nivel aumenta durante la gestación.

Teniendo en cuenta que la tTG es necesaria para que se formen en forma eficiente los portales fagocíticos de los macrófagos para efectuar el clearance de las células apoptóticas y que este proceso es esencial durante la gestación normal, continuamos nuestro trabajo explorando la expresión de la tTG a nivel de la superficie de los macrófagos de los ratones NOD.

En la Figura 3 (Art.3) se observa que los macrófagos peritoneales procedentes de hembras NOD preñadas expresan tTG, en más del 90% de las células analizadas se constató por inmunofluorescencia una fuerte expresión de la enzima a nivel de membrana (Figura 3A, Art.3).

Además, investigamos si la expresión de la enzima en los macrófagos de estos animales se ve modificada por el proceso de gestación, la Figura 3B (Art.3) muestra que los macrófagos provenientes de animales preñados (día 9 de gestación) expresan mayores niveles de tTG (detectados por RT-PCR) que aquellos procedentes de animales no preñados.

4.4 Los anticuerpos anti-tTG inhiben la fagocitosis de células apoptóticas por parte de macrófagos de ratones NOD.

Para dilucidar si los anticuerpos anti-tTG podían interferir en la fagocitosis de células apoptóticas por parte de los macrófagos de las hembras NOD preñadas utilizamos el AcMo 2G3.

En la Figura 4 (Art.3) se muestra que cuando estos macrófagos fueron pre-incubados con este anticuerpo redujeron su capacidad de fagocitar células apoptóticas, ya que tanto la habilidad para fagocitar cuerpos apoptóticos (porcentaje de fagocitosis) como la avidéz por internalizar más de un cuerpo apoptótico (índice apoptótico) de los macrófagos de las NOD preñadas se vieron significativamente reducidas por la presencia del anticuerpo anti-tTG (Figuras 4A y 4B, Art.3 respectivamente).

El efecto inhibitorio del AcMo 2G3 en la fagocitosis fue significativamente mayor que el observado con un suero BALB/c sin anticuerpos anti-tTG usado como control en las diferentes muestras de macrófagos de las NOD analizados (<5%). La Figura 4C (Art.3) muestra microfotografías representativas de la fagocitosis de timocitos apoptóticos por estos macrófagos.

En síntesis, en esta parte del trabajo los resultados obtenidos mostraron que los sueros de los ratones NOD contienen anticuerpos anti-tTG y que estos son además capaces de disminuir la actividad de transamidación de la enzima. Además demostramos que el AcMo 2G3 específico contra la tTG es capaz de unirse al tejido decidual de hembras NOD preñadas e inhibir la fagocitosis de células apoptóticas por parte de macrófagos provenientes de dichos animales los cuáles expresan tTG en su superficie.

Artículo 3



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Reproductive Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jreprimm



Anti-tissue transglutaminase antibody inhibits apoptotic cell clearance by macrophages in pregnant NOD mice

Cecilia Sónora^{a,b,*}, Gustavo Mourglia-Ettlin^a, Guillermina Calo^c, Vanesa Hauk^c, Rosanna Ramhorst^c, Ana Hernández^a, Claudia Pérez Leirós^c

^a Cátedra de Inmunología, Facultad de Ciencias/Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

^b Escuela Universitaria de Tecnología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

^c Laboratorio de Inmunofarmacología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, IQUIBICEN-CONICET, Buenos Aires, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 July 2013

Received in revised form 23 October 2013

Accepted 12 November 2013

Keywords:

Anti-tissue transglutaminase antibodies

Celiac disease

NOD mice

ABSTRACT

Autoimmunity is a feature of celiac disease (CD) with tissue transglutaminase (tTG) as a major autoantigen. A correlation between gynecological-obstetric disorders in CD patients and the presence of circulating antibodies anti-tTG that inhibited tTG activity was reported. Serum anti-tTG antibodies were detected in a non-obese diabetic (NOD) mouse model of type I insulin-dependent diabetes mellitus and Sjögren's syndrome, two comorbid states with CD. Since pregnancy complications have been described in NOD mice, we evaluated the ability of anti-tTG antibodies to affect the functions of tTG relevant to the normal course of an early pregnancy like extracellular matrix assembling and apoptotic cell phagocytosis by macrophages. Circulating IgG antibodies against tTG were detected in NOD mice with titers that decreased at early pregnancy; interestingly, the *in vitro* transamidating activity of tTG was reduced by NOD serum samples. Particularly, anti-tTG antibody inhibited apoptotic cell phagocytosis by peritoneal macrophages from pregnant NOD mice that express the enzyme on surface. Evidence provided support for a role for anti-tTG antibodies through reduced transamidating activity and reduced apoptotic cell clearance by the macrophages of pregnant NOD mice.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Pregnancy is a tightly regulated process, where systemic and local mechanisms act in synchronicity to allow the maternal immune system to tolerate the fetus. Especially at the early post-implantation stage, intense tissue remodeling and apoptosis of trophoblast cells occur in a homeostatic immunosuppressant microenvironment. Various immune cell populations contribute to this anti-inflammatory milieu, with macrophages taking center stage owing to their high functional plasticity (Mosser and

Edwards, 2008; Nagamatsu and Schust, 2010). In particular, macrophages bearing an alternative activated profile participate in wound healing processes and the silent clearance of apoptotic cells (Abrahams et al., 2004; Fest et al., 2007; Straszewski-Chavez et al., 2005).

The outcome of pregnancy may be impaired by several autoimmune conditions; celiac disease (CD) is a multifactorial disease (Garrote et al., 2008) with an incidence reaching 1% in western countries (Fasano et al., 2003; Dube et al., 2005) and increasing in prevalence worldwide (Cataldo and Montalto, 2007). Women appear to be preferentially affected (Bardella et al., 2005) and associated reproductive disorders have been extensively reported (Ozgor and Selimoglu, 2010; Soni and Badawy, 2010); however, the molecular mechanisms involved remain unknown.

Tissue transglutaminase (tTG; EC 2.3.2.13) is the specific autoantigen in CD (Dieterich et al., 1997) and specific

* Corresponding author at: Cátedra de Inmunología, Facultad de Ciencias/Facultad de Química, Universidad de la República, Instituto de Higiene, Alfredo Navarro 3051, CP 11600, Montevideo, Uruguay.
Tel.: +598 24801196.

E-mail address: csonora@fmed.edu.uy (C. Sónora).

IgA and/or IgG antibodies against tTG are often produced during active disease; several data suggest that these autoantibodies might play a role in the development of extraintestinal disorders associated with CD (Lindfors et al., 2010). In line with this, we have recently reported a significant correlation between the presence of gynecobstetric disorders in celiac women and the ability of serum to affect the *in vitro* tTG transamidation activity – an acyltransfer reaction between the γ -carboxamide group of peptide-bound glutamine and the ϵ -amino group of peptide-bound lysine (Sonora et al., 2011). tTG is localized to the endometrium and placenta at both the intracellular and extracellular compartments (Kabir-Salmani et al., 2005) where it can play biological roles in the remodeling of extracellular matrix, cell death, clearance of apoptotic cells and cell migration among others; some of these functions are mediated by its classical transamidation activity while others are independent of its catalytic functions (Fesus and Piacentini, 2002). tTG in particular has been involved in the clearance of apoptotic cells by macrophages and mice deficient for tTG showed an impaired phagocytic capacity (Toth et al., 2009).

The non-obese diabetic (NOD) mouse is a useful model for examining the immunoregulatory abnormalities that lead to autoimmune cell destruction and type I or insulin-dependent diabetes mellitus (T1DM) (Wicker et al., 2005). At the prediabetic stage, it models several features of Sjögren's syndrome (SS) (Delaleu et al., 2011). A loss of tolerance in the B cell compartment is one of the earliest indicators of the overt autoimmune process (Yu et al., 2000) with an active autoantibody repertoire observed as early as the 4th week of age with broad pathological potential (Thomas et al., 2002). Interestingly, the involvement of tTG has been associated with the disturbance in cellular homeostatic mechanisms in both SS-like and T1DM autoimmune stages (Di Sabatino et al., 2012).

Signs of pregnancy impairment were reported in NOD mice at the pre-diabetic and diabetic stages. A decline in litter size and increased resorption rates associated with local regulatory T cell and NK cell defective activity were reported (Burke et al., 2007; Lin et al., 2009; Roca et al., 2009). NOD mice spontaneously produce antibodies against tTG (Sblattero et al., 2005); however, the association between autoantibodies and reproductive complications in these animals has not been reported so far. In particular, since the direct role of anti-tTG antibodies in the phagocytic function of NOD mice macrophages has not yet been studied, and that the phagocytosis of apoptotic cells is one of the central functions of macrophages during early pregnancy, here we aimed to analyze the presence of anti-tTG antibodies in NOD mice serum and their ability to interfere with phagocytosis of apoptotic cells by the macrophages of pregnant NOD mice.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Normally cycling NOD and BALB/c mice of 16 weeks of age were mated with NOD and BALB/c males (syngeneic mating) and gestational day 0 was indicated by

a vaginal plug. NOD and BALB/c female mice were bred and maintained at the Central Animal Care Facility of the School of Exact and Natural Sciences, University of Buenos Aires (FCEyN-UBA). Mice were maintained on a 12:12 h light–dark schedule and fasted overnight with water *ad libitum* before being used. They were tested routinely for blood glucose levels and considered to be prediabetic as their values of serum glucose on two occasions over a 24-h period did not differ significantly from those of control mice (0.9 ± 0.1 g/l, $n = 38$). NOD mice, either normally cycling or at 9 days of gestation, were used for blood extraction, peritoneal macrophage isolation, and implantation site immunostaining. All studies were conducted according to standard protocols of the Animal Care and Use Committee of the FCEyN-UBA.

2.2. Anti-tTG antibodies determination in mice sera

Serum samples from NOD and BALB/c mice were diluted 1:100 in PBS–Tween 20 (0.05%) BSA 1% and the assay was carried out according to our previous work, but using appropriate dilutions of horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG or IgA antibodies (Sigma–Aldrich) (Sonora et al., 2011).

2.3. Total serum IgG quantifications in mice sera

Total IgG antibody titers were determined by capture ELISA using commercial reagents and the reciprocal endpoint technique. Briefly, 96-well plates were coated with goat anti-mouse IgG antibodies and appropriate serial dilutions of each sample were incubated in the same plate. After goat anti-mouse IgG conjugate incubation, the assay was completed as described above.

The reciprocal dilution value corresponding to an arbitrary OD value (0.3) was obtained from the dilution curve of each sample to report total IgG antibody levels (IgG titer).

2.4. tTG transamidating activity assay

The measurement of guinea pig tTG transamidating activity is based on the crosslinking of 5-(biotinamido)-pentylamine substrate (Pierce) into immobilized human fibronectin used as an acceptor protein. The assay was carried out according to our previous work (Sonora et al., 2011). To evaluate the effect of serum on transglutaminase activity of tTG, the amine substrate was added after incubating the serum samples from both BALB/c and NOD mice for 20 min at 37 °C and washings.

Each duplicate assay was performed in parallel with the competitive specific inhibitor monodansylcadaverine at 250 μ M as a control. tTG activity in the presence of serum is indicated as relative activity, expressed as a percentage of the basal activity obtained without the addition of serum (relative activity = $OD_{\text{serum}} \times 100 / OD_{\text{basal}}$).

2.5. Immunostaining of NOD endometrium tissue sections

Sections of pregnant uteri from 16-week-old NOD mice at day 9 of gestation were fixed in 4% paraformaldehyde,

pretreated with normal goat serum and then incubated overnight at 4  C, with a serum sample from BALB/c mice (1:100) or tTG-specific mouse IgG monoclonal antibody 2G3 (1:100) as a positive control (Di Niro et al., 2005), kindly provided by Dr. F. Chirido from the University of La Plata, Argentina. The assay was carried out according to our previous work (Sonora et al., 2011), but using appropriate dilutions of biotinylated goat anti-mouse immunoglobulin (Thermo Scientific) and peroxidase-conjugated streptavidin.

2.6. tTG expression in NOD mice peritoneal macrophages by RT-PCR and immunofluorescence

Resident nonstimulated macrophages were isolated from the peritoneal cavity of pregnant NOD and BALB/c mice at day 9 with ice-cold HANKS, washed thoroughly and suspended in RPMI-10% BFS before plated in 24-well plates as previously described (Larocca et al., 2011). Macrophage cell suspension (>85% F4/80+ by flow cytometry) from each individual pregnant mouse was analyzed separately for the expression of tTG by RT-PCR or immunofluorescence or used in phagocytosis experiments. For RT-PCR, RNA was isolated with TRIzol  reagent (Life Technologies), cDNAs were generated from 1  g of RNA using a MMLV reverse transcriptase, RNase inhibitor, and oligodT kit (Promega). Forward and reverse primers (tTG: Forward: CACACCACAGGAGAAGAGCGAAGG; Reverse: ATCCAGTCCACCACATCAGCGTGG, GAPDH: Forward TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG, Reverse: TCCTGGAGGCCATGTAGGCCAT) were used at the following conditions: 94  C for 10 min, 35 cycles of 94  C for 20 s, 66  C for 20 s, 72  C for 20 s, and 72  C for 10 min. PCR products were detected as in previous work (Roca et al., 2009) and results expressed as arbitrary units normalized to GAPDH expression. Immunofluorescence for the assessment of tTG protein expression and localization was performed on macrophages plated on glass coverslips into 24-well plates, fixed with methanol and incubated with monoclonal antibody anti-tTG (2G3; 1:60 in PBS-Tween) after blocking with BSA 0.5% and revealed with an anti-mouse FITC (1:100; Sigma-Aldrich).

2.7. Phagocytosis of apoptotic thymocytes by NOD macrophages

Apoptotic thymocyte phagocytosis by pregnant NOD mice macrophages was carried out as previously described (Larocca et al., 2011). NOD mice thymocytes were induced to apoptosis with 1×10^{-8} M dexamethasone for 4 h and then added to a monolayer of macrophages isolated from each pregnant NOD mouse in a 1:5 ratio (2.5×10^5 macrophages: 1.25×10^6 thymocytes). After incubation for 90 min and washing, cells were stained with hematoxylin and eosin and counted. Before the addition of apoptotic thymocytes, macrophages were incubated for 30 min with monoclonal anti-tTG antibody (2G3; 1/60) or normal BALB/c mouse serum (1/30) as a negative control. Results were expressed as percentage of phagocytosis and phagocytic index.

2.8. Statistical analysis

Mann–Whitney test and Wilcoxon matched pairs signed rank test were used to compare experimental data obtained from independent or paired samples, respectively. Spearman test was used to evaluate the correlation among experimental data. Statistical calculations were performed using the GraphPad Prism Software version 5.00 Demo. Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Levels of anti-tTG antibodies in pregnant and normally cycling NOD mice serum and inhibition of enzyme transamidating activity

First, we analyzed the levels of anti-tTG antibodies in pre-diabetic NOD female mice sera compared with BALB/c mice and pregnant NOD mice under normal breeding conditions.

Our results show that sera from nonpregnant NOD mice have a significantly higher concentration of IgG antibodies against tTG than age-matched BALB/c mice determined by ELISA (medians 0.767 vs. 0.414, respectively, $P = 0.019$; Fig. 1A). In contrast, there were no significant differences in total IgG between pregnant pre-diabetic NOD and BALB/c mice (Fig. 1B). We could not detect IgA anti-tTG antibodies in any of the mice groups. When comparing the level of anti-tTG antibodies in sera from pregnant and nonpregnant pre-diabetic NOD mice, we observed lower levels of IgG anti-tTG antibody titers at day 9 of gestation (medians 0.409 vs. 0.767, respectively, $P = 0.020$; Fig. 1A) whereas no changes were found in total IgG (Fig. 1B). Anti-tTG antibody levels in pregnant BALB/c mice were similar to those in nonpregnant BALB/c mice (not shown).

We next analyzed the effect of NOD sera containing specific antibodies on transamidating activity *in vitro*, since this activity is necessary for many processes including extracellular matrix remodeling (Belkin, 2011) and TGF- 1 incorporation to the extracellular matrix in order to be activated (Verderio et al., 1999). As can be seen in Fig. 1C, NOD mice sera decreased transamidating activity (23–54% of decrease from basal activity), whereas sera from control BALB/c mice did not modify or increase the *in vitro* enzyme activity. The competitive specific inhibitor monodansylcadaverine used as a control decreased transamidating activity an average of 70% from basal activity (data not shown). There was no significant correlation between the effect determined on enzyme activity and IgG anti-tTG antibody concentrations in mice sera (Spearman's test).

3.2. Anti-tTG antibodies recognize pregnant uterus structures

Based on the reduced levels of serum autoantibodies against tTG in pregnant NOD mice on day 9 of gestation compared with nonpregnant NOD mice, we hypothesized that they could have been absorbed into the pregnant uterus; thus, we explored whether maternal–placental interface structures can specifically bind anti-tTG

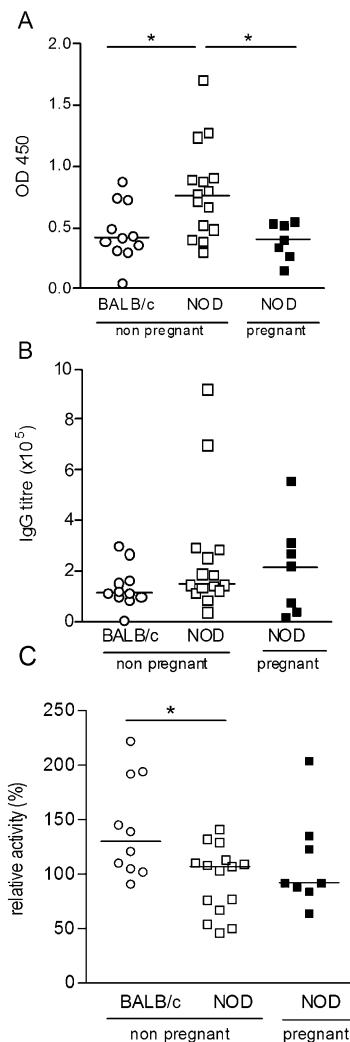


Fig. 1. Anti-tTG antibody determination in mice sera. Levels of specific IgG against tTG determined by ELISA are shown for 16-week-old BALB/c and NOD mice under nonpregnant conditions and for pregnant NOD mice on day 9 of gestation (A). Titers of total IgG antibodies are shown for each individual (B). *In vitro* transamidating tTG activity was evaluated under basal conditions and in the presence of 1:100 diluted mice serum. Relative activity (%) = OD serum $\times$ 100/basal OD is indicated for each sample (C). *Statistically significant difference between groups is indicated ($P < 0.05$, Mann–Whitney test).

antibodies. Slices of viable implantation sites from NOD mice on day 9 of gestation were incubated with an anti-tTG monoclonal antibody (2G3) or BALB/c mice as a negative control. Fig. 2A and B shows specific labeling of basal cytoplasm of epithelial cells and uterine glands by the monoclonal anti-tTG antibody. Also, small cells within the endometrial stroma were positive for 2G3 immunostaining. There was no label with BALB/c control mice antibodies (Fig. 2C).

3.3. tTG expression in pregnant NOD macrophages

On the basis that tTG is required to form an efficient engulfing portal for the clearance of apoptotic cells by macrophages, and that this process is essential in normal pregnancy, we next explored tTG expression on the surface of NOD macrophages. Fig. 3A shows that resting peritoneal

macrophages isolated from pregnant NOD mice expressed tTG. More than 90% of macrophages expressed the enzyme with a major surface membrane localization as revealed by immunofluorescence. Besides, we investigated whether enzyme expression was modified by pregnancy in peritoneal macrophages. Fig. 3B shows that the macrophages of day 9 pregnant NOD mice expressed significantly higher levels of tTG than nonpregnant, age-matched NOD mice. Interestingly, when BALB/c mice macrophages were analyzed for tTG expression, a high level of expression was found even in nonpregnant mice and their levels were similar to those of NOD pregnant macrophages (not shown).

3.4. Inhibitory effect of anti-tTG antibodies on the phagocytosis of apoptotic cells by NOD mice macrophages

To address if anti-tTG antibodies could impair phagocytosis of apoptotic cells by resting peritoneal macrophages of pregnant NOD mice, we used the anti-tTG monoclonal antibody. Fig. 4A shows that when macrophages from pregnant NOD mice expressing tTG on their surface were pre-incubated with anti-tTG antibody, they reduced their capacity to phagocyte apoptotic cells. In particular, both the ability to engulf apoptotic bodies (percentage phagocytosis) and the avidity to engulf more than one apoptotic body (phagocytic index) of the macrophages of pregnant NOD mice was significantly reduced by the anti-tTG antibody (Fig. 4A and B, respectively). Fig. 4C shows representative microphotographs of apoptotic cell engulfment by NOD macrophages. The inhibitory effect of the anti-tTG antibody on phagocytosis was significantly higher than the <5% inhibition of phagocytosis shown by a normal mouse serum (1:30) used as a control for the different NOD mice macrophages tested (data not shown).

4. Discussion

Reproductive health is often compromised in untreated celiac women (Ozgor and Selimoglu, 2010). Recurrent early miscarriages (Ciacci et al., 1996) and premature and low-birth-weight babies (Martinelli et al., 2000) have been reported, but the mechanisms underlying these pregnancy complications are still unknown.

Tissue transglutaminase, the main autoantigen of CD, is a multifunctional enzyme (Belkin, 2011) that is widely expressed in most tissues, including the human maternal–fetal interface (Robinson et al., 2006; Kabir-Salmani et al., 2005). It controls cell and tissue homeostasis through its involvement in proliferation, terminal differentiation, and apoptosis (Fesus and Piacentini, 2002; Rossin et al., 2012). At the cell surface, tTG is involved in adhesive and signaling functions acting as a co-receptor through its association with $\beta_1/\beta_3/\beta_5$ integrins, thus playing a central role in cell adhesion and migration (Akimov and Belkin, 2001). Extracellular tTG contributes to the stabilization of the extracellular matrix and tissue repair provided its high affinity interaction with fibronectin (Upchurch et al., 1991) and owing to transamidating activity, tTG also mediates TGF- β 1 incorporation into the extracellular matrix in order to facilitate its activation (Verderio et al., 1999).

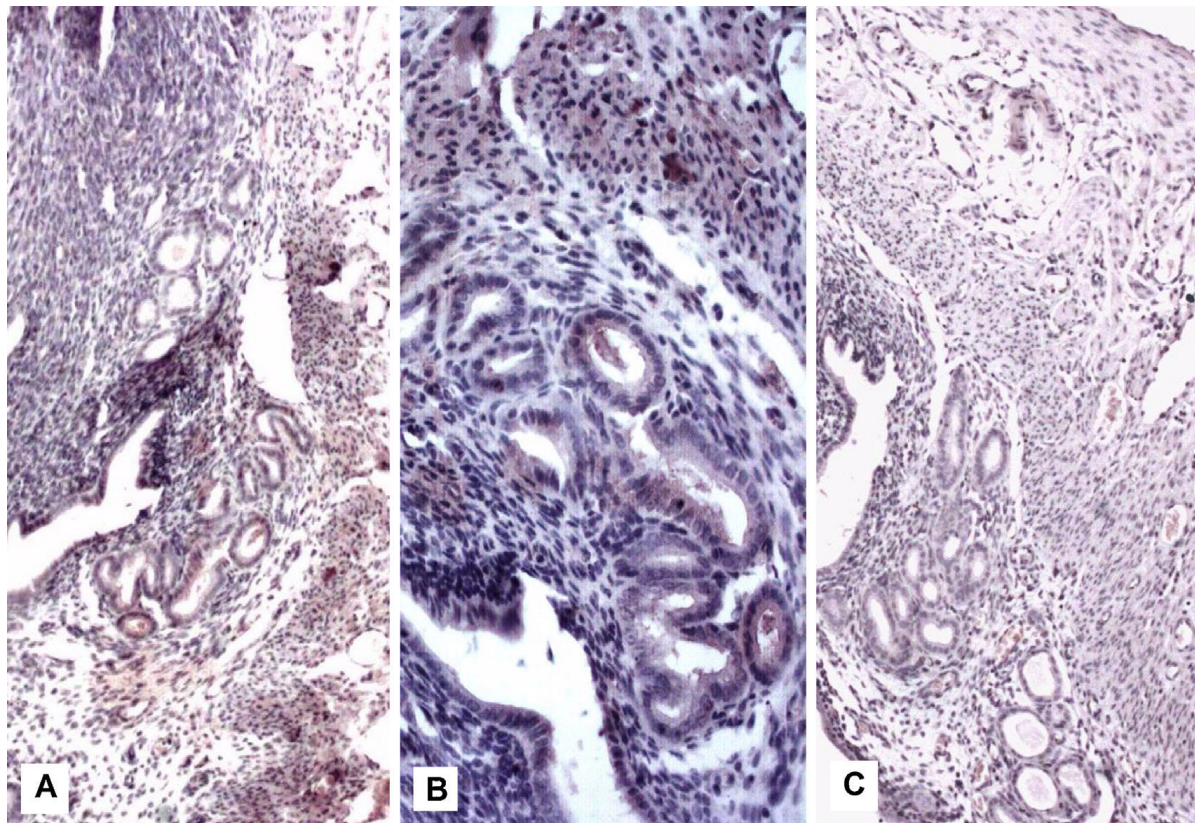


Fig. 2. Anti-tTG antibodies bind to uterine structures. Histological sections of NOD pregnant endometrium were incubated with anti-tTG monoclonal antibody 2G3 (A, B) or BALB/c serum (C). NOD mice implantation sites isolated on day 9 of gestation were fixed for immunohistochemistry studies as described in Section 2. Photographs are representative of at least three experiments with different NOD mice uterine slices. A, C (100 $\times$); B (400 $\times$).

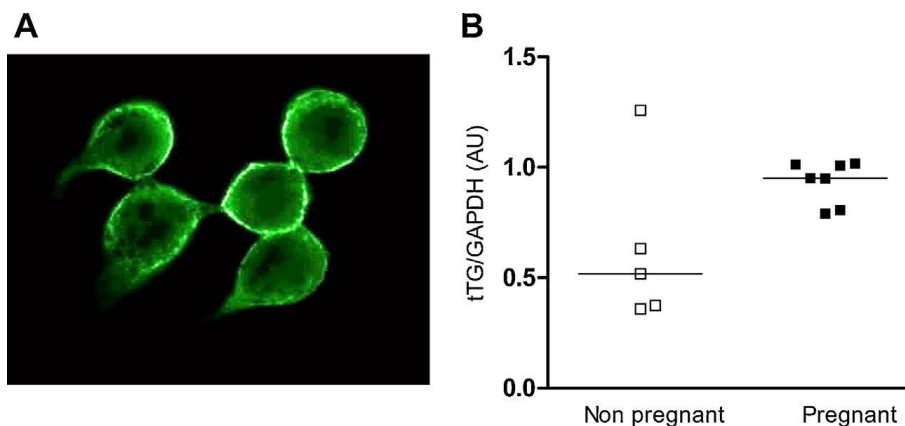


Fig. 3. tTG expression in the peritoneal macrophages of NOD mice by immunofluorescence and RT-PCR. Resting peritoneal macrophages isolated from pregnant NOD mice were incubated with anti-tTG monoclonal antibody 2G3 (1:60) and anti-mouse immunoglobulin FITC-conjugated antibody (1:100) representative microphotograph (1000 $\times$) (A). tTG expression levels determined by RT-PCR are shown for 16-week-old NOD mice that were either nonpregnant or pregnant on day 9 of gestation and results shown are median values as described in Section 2 (B).

In addition, macrophage surface tTG is involved in the clearance of apoptotic cells (Toth et al., 2009).

Immunological mechanisms of reproductive disorders in CD can be postulated on the basis of the presence of antibodies against this enzyme, which participates in endometrial physiological processes throughout the menstrual cycle, during decidualization (Signorini et al., 1988) and implantation (Kabir-Salmani et al., 2005). In line with this, we have recently reported an association of reproductive complications and anti-tTG antibody titers in women with CD (Sonora et al., 2011).

Based on reports in patients with CD and on the knowledge that pre-diabetic NOD mice spontaneously produce anti-tTG antibodies and show early pregnancy complications, we analyzed the presence of anti-tTG antibodies in pregnant NOD mice serum and its potential impact on macrophage phagocytic function during early gestation. Here, we present evidence indicating that anti-tTG antibodies are present in NOD mice sera, decrease transamidating activity, bind to the NOD pregnant endometrial cells and inhibit the phagocytosis of apoptotic cells by pregnant NOD mice macrophages that express

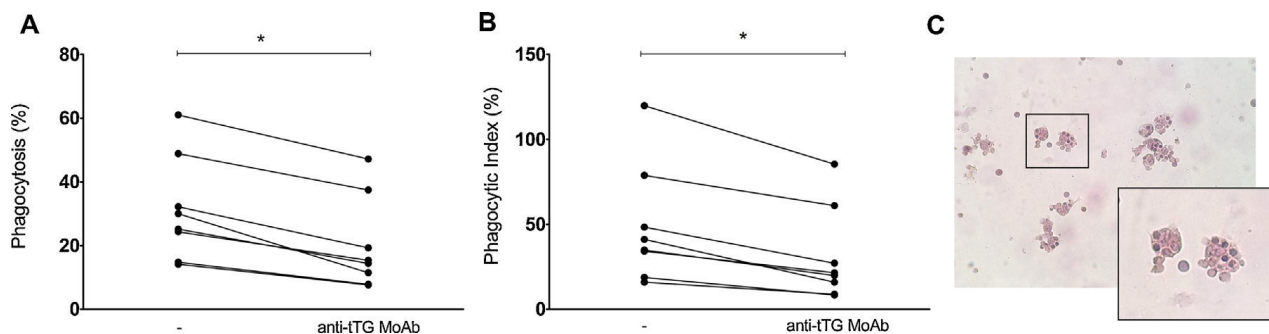


Fig. 4. Anti-tTG antibody inhibits apoptotic cell phagocytosis by the macrophages of pregnant NOD mice. Peritoneal macrophages were isolated from pregnant NOD mice on day 9 and cultured for 90 min with apoptotic thymocytes in the presence or absence of anti-tTG monoclonal antibody 2G3 as indicated in Section 2. Percentage of phagocytosis (A) and the phagocytic index (B) were calculated for each individual mouse sample. *Statistically significant differences between groups are indicated ($P < 0.05$, Wilcoxon matched pairs signed rank test). Representative microphotographs of apoptotic cell phagocytosis by NOD macrophages 100 $\times$ and detail 400 $\times$ (C).

tTG. These conclusions are based on the following results. First, higher concentrations of anti-tTG antibodies were found in NOD mice of 16 weeks of age compared with age-matched BALB/c mice, and these antibodies inhibit enzyme transamidating activity *in vitro*. Second, circulating anti-tTG antibodies in NOD mice sera were reduced in circulation on day 9 of gestation, reaching the normal levels seen in nonpregnant BALB/c mice. Third, tTG expression was significantly higher in macrophages of pregnant NOD mice compared with nonpregnant mice, and the monoclonal anti-tTG antibody impaired the phagocytosis of apoptotic cells by pregnant NOD macrophages, an effect that was not seen with a normal mouse serum.

The fact that tTG expressed in endometrial structures can be recognized by specific autoantibodies could have implications in the outcome of pregnancy. The decrease in tTG-specific antibodies in NOD mice serum at day 9 of pregnancy suggests a rapid *in vivo* recognition and clearance from circulation. In line with this, immunohistochemistry studies indicated that tTG-specific monoclonal antibodies recognize this epitope on different structures of the pregnant uterus of NOD mice. Moreover, since tTG transamidating activity is involved in wound healing and tissue remodeling and here we showed that anti-tTG antibody sera reduced transamidating activity of the enzyme *in vitro*, it is conceivable that these antibodies might play a pathogenic role in the impaired pregnancy score of NOD mice. In line with this, low levels of anti-tTG antibodies found in control BALB/c mice serum inhibited neither tTG transamidation activity nor bound uterine structures.

Inhibition of tTG enzyme activity and function by specific antibodies has been reported in different *in vitro* assays altering endothelial permeability, angiogenesis, and cell differentiation and proliferation (Caja et al., 2011), arguing that anti-tTG antibodies could be involved in pathogenesis. In particular, macrophage surface tTG appears to be involved in the clearance of apoptotic cells by promoting efficient signaling in the phagocytic cell, acting as a $\beta 3$ integrin co-receptor in macrophages (Toth et al., 2009). In the absence of tTG, integrin $\beta 3$ does not adequately recognize apoptotic cells, with the consequent impairment in the formation and stabilization of engulfing portals (Toth et al., 2009). Of note, tTG^{-/-} mice presented a defective

clearance of apoptotic cells and developed autoimmunity in an age-dependent manner (Szondy et al., 2003).

The inhibition of phagocytosis of apoptotic cells by the macrophages of pregnant NOD mice shown here supports tTG antibodies playing a pathogenic role during early pregnancy. The effect was consistently found in all individually tested macrophages of pregnant NOD mice, whereas phagocytosis was not modified by normal mice serum, suggesting the specificity of tTG recognition on macrophages. On the other hand, the evidence that tTG is increased in pregnant compared with nonpregnant NOD mice suggests that probably macrophage tTG is involved in different processes occurring at the maternal-placental interface other than the silent clearance of apoptotic cells. In fact, our results are consistent with previous observations on the upregulation of tTG expression during macrophage differentiation. In those studies, tTG accumulated rapidly and reversibly in mouse peritoneal macrophages cultured in mouse serum or plasma or previously primed *in vivo* with thioglycolate, but not when they were stimulated with pro-inflammatory bacterial stimuli (Murtaugh et al., 1983). Interestingly, the expression of tTG markedly increased in macrophages during differentiation from monocytes (Murtaugh et al., 1983; Mehta et al., 1985) and this effect has been associated with an enhanced migration on fibronectin (Mehta et al., 1985; Akimov and Belkin, 2001). Consistently, the down-regulation of surface tTG and its functional inhibition by blocking antibodies significantly decreased adhesion and spreading of monocytic cells as well as reducing the migration of myeloid cells (Akimov and Belkin, 2001). It is probable that more than one of these mechanisms could be operating *in vivo* in early pregnancy in NOD mice, particularly the adequate formation of engulfing portals by the blockade of macrophage tTG by autoantibodies might play a significant role. Moreover, on the knowledge that a constant level of about 20–30% of macrophages are found in deciduas throughout pregnancy and that this requires the permanent migration of monocytes from circulation to the pregnant uterus where they differentiate to macrophages (Fest et al., 2007; Mor and Cardenas, 2010), and considering the reported up-regulation of tTG during monocyte to macrophage differentiation, the increased tTG expression

in the macrophages of pregnant NOD mice might reflect a pregnancy-associated state of activation.

To our knowledge, this report describes for the first time that tTG-binding antibodies present in the serum of NOD mice can limit tTG activity and that the specific recognition of tTG expressed on pregnant NOD mice macrophages interfere with the phagocytosis of apoptotic cells. Our data provide new evidence to support a possible link between anti-tissue transglutaminase antibodies and impaired reproductive scoring reported in NOD mice.

Acknowledgements

We acknowledge Dr. Roberto Meiss and Dr. Verónica Beovide for collaboration in histological analysis and image acquisition. This study was supported by grants to C.P.L. (UBACyT 2011–2014 20020100100505 and PICT 2011–0144 from ANPCyT), grant to R.R. (UBACyT 2012–2015 20020090200034) and partial support from PEDECIBA (Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas, PNUD), ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación) and ESCALA program for teachers exchange of AUGM (Asociación de Universidades del Grupo Montevideo).

References

- Abrahams, V.M., Kim, Y.M., Straszewski, S.L., Romero, R., Mor, G., 2004. Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 51, 275–282.
- Akimov, S.S., Belkin, A.M., 2001. Cell surface tissue transglutaminase is involved in adhesion and migration of monocytic cells on fibronectin. *Blood* 98, 1567–1576.
- Bardella, M.T., Fredella, C., Saladino, V., Trovato, C., Cesana, B.M., Quatrini, M., et al., 2005. Gluten intolerance: gender- and age-related differences in symptoms. *Scand. J. Gastroenterol.* 40, 15–19.
- Belkin, A.M., 2011. Extracellular TG2: emerging functions and regulation. *FEBS J.* 278, 4704–4716.
- Burke, S.D., Dong, H., Hazan, A.D., Croy, B.A., 2007. Aberrant endometrial features of pregnancy in diabetic NOD mice. *Diabetes* 56, 2919–2926.
- Caja, S., Maki, M., Kaukinen, K., Lindfors, K., 2011. Antibodies in celiac disease: implications beyond diagnostics. *Cell. Mol. Immunol.* 8, 103–109.
- Cataldo, F., Montalto, G., 2007. Celiac disease in the developing countries: a new and challenging public health problem. *World J. Gastroenterol.* 13, 2153–2159.
- Ciacci, C., Cirillo, M., Auriemma, G., Di Dato, G., Sabbatini, F., Mazzacca, G., 1996. Celiac disease and pregnancy outcome. *Am. J. Gastroenterol.* 91, 718–722.
- Delaleu, N., Nguyen, C.Q., Peck, A.B., Jonsson, R., 2011. Sjogren's syndrome: studying the disease in mice. *Arthritis Res. Ther.* 13, 217.
- Di Niro, R., Ferrara, F., Not, T., Bradbury, A.R., Chirdo, F., Marzari, R., et al., 2005. Characterizing monoclonal antibody epitopes by filtered gene fragment phage display. *Biochem. J.* 388, 889–894.
- Di Sabatino, A., Vanoli, A., Giuffrida, P., Luinetti, O., Solcia, E., Corazza, G.R., 2012. The function of tissue transglutaminase in celiac disease. *Autoimmun. Rev.* 11, 746–753.
- Dieterich, W., Ehnis, T., Bauer, M., Donner, P., Volta, U., Riecken, E.O., et al., 1997. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat. Med.* 3, 797–801.
- Dube, C., Rostom, A., Sy, R., Cranney, A., Saloojee, N., Garritty, C., et al., 2005. The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk Western European populations: a systematic review. *Gastroenterology* 128, S57–S67.
- Fasano, A., Berti, I., Gerarduzzi, T., Not, T., Colletti, R.B., Drago, S., et al., 2003. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch. Intern. Med.* 163, 286–292.
- Fest, S., Aldo, P.B., Abrahams, V.M., Visintin, I., Alvero, A., Chen, R., et al., 2007. Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory network for the protection of pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 57, 55–66.
- Fesus, L., Piacentini, M., 2002. Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* 27, 534–539.
- Garrote, J.A., Gomez-Gonzalez, E., Bernardo, D., Arranz, E., Chirdo, F., 2008. Celiac disease pathogenesis: the proinflammatory cytokine network. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 47 (Suppl. 1), S27–S32.
- Kabir-Salmani, M., Shiokawa, S., Akimoto, Y., Sakai, K., Iwashita, M., 2005. Tissue transglutaminase at embryo-maternal interface. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 4694–4702.
- Larocca, L., Hauk, V., Calafat, M., Roca, V., Fraccaroli, L., Franchi, A., et al., 2011. Modulation of macrophage inflammatory profile in pregnant nonobese diabetic (NOD) mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* 333, 112–118.
- Lin, Y., Xu, L., Jin, H., Zhong, Y., Di, J., Lin, Q.D., 2009. CXCL12 enhances exogenous CD4+CD25+T cell migration and prevents embryo loss in non-obese diabetic mice. *Fertil. Steril.* 91, 2687–2696.
- Lindfors, K., Maki, M., Kaukinen, K., 2010. Transglutaminase 2-targeted autoantibodies in celiac disease: pathogenetic players in addition to diagnostic tools? *Autoimmun. Rev.* 9, 744–749.
- Martinelli, P., Troncone, R., Paparo, F., Torre, P., Trapanese, E., Fasano, C., et al., 2000. Coeliac disease and unfavourable outcome of pregnancy. *Gut* 46, 332–335.
- Mehta, K., Lopez-Berestein, G., Moore, W.T., Davies, P.J., 1985. Interferon-gamma requires serum retinoids to promote the expression of tissue transglutaminase in cultured human blood monocytes. *J. Immunol.* 134, 2053–2056.
- Mor, G., Cardenas, I., 2010. The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am. J. Reprod. Immunol.* 63, 425–433.
- Murtaugh, M.P., Mehta, K., Johnson, J., Myers, M., Juliano, R.L., Davies, P.J., 1983. Induction of tissue transglutaminase in mouse peritoneal macrophages. *J. Biol. Chem.* 258, 11074–11081.
- Mosser, D.M., Edwards, J.P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 958–969.
- Nagamatsu, T., Schust, D.J., 2010. The contribution of macrophages to normal and pathological pregnancies. *Am. J. Reprod. Immunol.* 63, 460–471.
- Ozgor, B., Selimoglu, M.A., 2010. Celiac disease and reproductive disorders. *Scand. J. Gastroenterol.* 45, 395–402.
- Robinson, N.J., Glazier, J.D., Greenwood, S.L., Baker, P.N., Aplin, J.D., 2006. Tissue transglutaminase expression and activity in placenta. *Placenta* 27, 148–157.
- Roca, V., Calafat, M., Larocca, L., Ramhorst, R., Farina, M., Franchi, A.M., et al., 2009. Potential immunomodulatory role of VIP in the implantation sites of prediabetic nonobese diabetic mice. *Reproduction* 138, 733–742.
- Rossin, F., D'Eletto, M., Macdonald, D., Farrace, M.G., Piacentini, M., 2012. TG2 transamidating activity acts as a reostat controlling the interplay between apoptosis and autophagy. *Amino Acids* 42, 1793–1802.
- Sblattero, D., Maurano, F., Mazzeella, G., Rossi, M., Auricchio, S., Florian, F., et al., 2005. Characterization of the anti-tissue transglutaminase antibody response in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* 174, 5830–5836.
- Signorini, M., Pansini, F., Bonaccorsi, G., Mollica, G., Ferrari, C., Bergamini, C.M., 1988. Regulation of endometrial transglutaminase activity during the menstrual cycle. *Biochem. Int.* 16, 77–82.
- Soni, S., Badawy, S.Z., 2010. Celiac disease and its effect on human reproduction: a review. *J. Reprod. Med.* 55, 3–8.
- Sonora, C., Munoz, F., Del Rio, N., Acosta, G., Montenegro, C., Trucco, E., et al., 2011. Celiac disease and gynecologic complications: can serum antibodies modulate tissue transglutaminase functions and contribute to clinical pattern? *Am. J. Reprod. Immunol.* 66, 476–487.
- Straszewski-Chavez, S.L., Abrahams, V.M., Mor, G., 2005. The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. *Endocr. Rev.* 26, 877–897.
- Szondy, Z., Sarang, Z., Molnar, P., Nemeth, T., Piacentini, M., Mastrobardino, P.G., et al., 2003. Transglutaminase 2^{-/-} mice reveal a phagocytosis-associated crosstalk between macrophages and apoptotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 7812–7817.
- Thomas, J.W., Kendall, P.L., Mitchell, H.G., 2002. The natural autoantibody repertoire of nonobese diabetic mice is highly active. *J. Immunol.* 169, 6617–6624.
- Toth, B., Garabuczi, E., Sarang, Z., Vereb, G., Vamosi, G., Aeschlimann, D., et al., 2009. Transglutaminase 2 is needed for the formation of an efficient phagocyte portal in macrophages engulfing apoptotic cells. *J. Immunol.* 182, 2084–2092.
- Upchurch, H.F., Conway, E., Patterson Jr., M.K., Maxwell, M.D., 1991. Localization of cellular transglutaminase on the extracellular matrix after wounding: characteristics of the matrix bound enzyme. *J. Cell. Physiol.* 149, 375–382.
- Verderio, E., Gaudry, C., Gross, S., Smith, C., Downes, S., Griffin, M., 1999. Regulation of cell surface tissue transglutaminase: effects on matrix

- storage of latent transforming growth factor-beta binding protein-1. *J. Histochem. Cytochem.* 47, 1417–1432.
- Wicker, L.S., Clark, J., Fraser, H.I., Garner, V.E., Gonzalez-Munoz, A., Healy, B., et al., 2005. Type 1 diabetes genes and pathways shared by humans and NOD mice. *J. Autoimmun.* 25, 29–33, Suppl.
- Yu, L., Robles, D.T., Abiru, N., Kaur, P., Rewers, M., Kelemen, K., et al., 2000. Early expression of antiinsulin autoantibodies of humans and the NOD mouse: evidence for early determination of subsequent diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 1701–1706.

Discusión global y Conclusiones

Como el objetivo general de este trabajo es aportar a la comprensión de los mecanismos inmunopatogénicos involucrados en la enfermedad celíaca, particularmente aquellos que afecten la salud reproductiva de las pacientes, y en pos de cumplir el primer objetivo específico de analizar si la presentación clínica de la EC se correlaciona con el perfil de anticuerpos específicos para la tTG, gliadina y otros autoantígenos que presentan los pacientes, la etapa inicial de esta tesis consistió en la integración y caracterización de la reactividad de los anticuerpos de un panel de sueros derivados de mujeres con diagnóstico recientemente confirmado de EC. Si bien nuestro trabajo no fue planteado con un objetivo epidemiológico los datos de incidencia de las presentaciones atípicas de la EC y en particular la ocurrencia de complicaciones gineco obstétricas fueron consistentes con datos reportados en la bibliografía (Tersigni, Castellani et al. 2014); a pesar de ello reconocemos que la integración del grupo puede tener cierto sesgo, ya que parte de las mujeres que participaron en el estudio fueron derivadas a través de ACELU y manifestaban expresamente su preocupación por los trastornos referidos, en particular los vinculados a la esterilidad y abortos espontáneos.

La presencia de anticuerpos específicos contra la tTG es una característica de la enfermedad celíaca cuando los pacientes no se encuentran en dieta libre de glúten.

La tTG adopta varias conformaciones espaciales en su expresión en la superficie celular; en presencia de GDP, presenta una conformación cerrada con la triada catalítica no expuesta mientras que la exposición del sitio activo ocurre en presencia de calcio, condiciones en las cuales presenta actividad de transamidación, en una conformación abierta y extendida.

Por este motivo, en los sistemas *in vitro*, se pretende reproducir ambas conformaciones, por ejemplo incorporando calcio en el medio de sensibilización de las placas de ELISA para simular la conformación de la enzima en condiciones catalíticamente activa.

Los trabajos previos que analizaron la reactividad de los sueros de pacientes celíacos con la tTG adoptaron diversas estrategias con el fin de dilucidar los epítopes de la enzima involucrados en el reconocimiento. Las estrategias consistieron en analizar la reactividad de sueros de pacientes celíacos contra i) fragmentos de la tTG humana (Seissler, Wohlrab et al. 2001; Sblattero, Florian et al. 2002; Nakachi, Powell et al. 2004); ii) péptidos de tTG expresados en la superficie de fagos mediante la técnica de phage display (Marzari, Sblattero et al. 2001) y iii) moléculas de tTG con mutaciones en los distintos dominios funcionales (Byrne, Ryan et al. 2007).

En conjunto, estos trabajos muestran que varios dominios están implicados en el reconocimiento y que las mutaciones que afectan varios dominios alteran la reactividad particularmente cuando el blanco incluye al dominio central con la triada catalítica.

Además, los epítopes serían principalmente conformacionales, como lo demuestran los ensayos que analizan la reactividad contra tTG desnaturalizada con agentes caotrópicos (Simon-Vecsei, Kiraly et al. 2012) y el trabajo de De Niro (Di Niro, Ferrara et al. 2005), en el cual no se identificaron anticuerpos monoclonales derivados del intestino de pacientes celíacos capaces de interactuar con fragmentos lineales.

En un trabajo reciente de modelado molecular basado en la generación de mutaciones puntuales dirigidas de la tTG así como de delección de cada uno de los cuatro dominios se propone un epítipo conformacional que sería reconocido en forma uniforme por la mayoría de los anticuerpos producidos por los individuos celíacos; este epítipo se expresaría en ambas conformaciones de la tTG (cerrada y abierta), y por lo tanto en los tejidos sería reconocido independientemente de los niveles de calcio, y en particular cuando la tTG esté unida a fibronectina. Este epítipo involucra residuos de los dominios N terminal, C terminal y del core catalítico (dominio II), en particular se propone a la Glu 153

como el principal residuo involucrado en la interacción con los anticuerpos, en cooperación con Arg 19 y Met 659 pertenecientes a los dominios I y IV respectivamente; los autores plantean una producción relativamente homogénea de anticuerpos en la población celíaca, aunque el trabajo describe una variabilidad individual considerable contra algunas de las moléculas de tTG con mutaciones puntuales que involucran la región N terminal únicamente (Simon-Vecsei, Kiraly et al. 2012).

En suma, los trabajos realizados sobre poblaciones diversas de sueros de celíacos muestran consistentemente que la respuesta es dispersa y variable entre individuos, si bien un epítoto parece ser predominante. Sin embargo, no hay trabajos que vinculen las diferencias de la especificidad fina con los perfiles clínicos de la población de estudio.

En este trabajo realizamos, como primera aproximación para investigar los mecanismos inmunológicos involucrados en la patogénesis de las manifestaciones sistémicas de la enfermedad celíaca, el análisis de la correlación existente entre los síntomas extra-digestivos y el efecto *in vitro* de los sueros de celíacos en dos ensayos experimentales que evalúan indirectamente la unión de los anticuerpos a la zona de interacción con la FN y su efecto sobre la actividad de transamidación de la enzima.

Nuestros resultados sugieren la expresión de una distribución heterogénea de especificidades finas de los anticuerpos IgA anti-tTG dentro de las pacientes que conforman nuestro grupo de estudio dado que se observaron comportamientos diferenciales en ambos ensayos. Establecimos una correlación significativa entre la presencia de una historia de complicaciones ginecológicas y/u obstétricas y la capacidad *in vitro* de los sueros de modificar la actividad de transamidación de la enzima, interesantemente los sueros procedentes del grupo de mujeres con antecedentes gineco-obstétricos inducen de forma significativa una mayor inhibición de dicha actividad que aquellos derivados de controles (mujeres no celíacas) o los procedentes de celíacas sin este tipo de antecedentes. Profundizando en los análisis encontramos que los valores más altos de inhibición

eran los pertenecientes a los sueros provenientes de pacientes con historia de abortos y alteraciones del ciclo menstrual.

Los trastornos gineco-obstétricos en algunos casos se presentaron meses o años antes al diagnóstico y por lo tanto a la obtención de la muestra de estudio para nuestro análisis. Si bien podríamos cuestionarnos en principio que el perfil de reactividad fina hubiese cambiado durante el transcurso de la enfermedad, se ha reportado que el fenómeno de spreading antigénico asociado a enfermedades autoinmunes en general no es una característica de la EC y el análisis de la reactividad fina contra mutantes de la tTG en muestras pareadas de sueros de individuos celíacos en periodos de hasta 17 años no mostró variaciones significativas (Simon-Vecsei, Kiraly et al. 2012).

La asociación entre la EC y los problemas reproductivos y ginecológicos de las mujeres está ampliamente documentado (Molteni, Bardella et al. 1990; Ciacci, Cirillo et al. 1996; Smecuol, Maurino et al. 1996; Martinelli, Troncone et al. 2000; Stazi and Mantovani 2000; Rostami, Steegers et al. 2001; Tersigni, Castellani et al. 2014) sin embargo no se conocen aún en forma clara los mecanismos subyacentes a estas alteraciones ni se han propuesto los cofactores que podrían contribuir a estas complicaciones en parte de las mujeres celíacas.

Se puede postular la existencia de mecanismos de base inmunológica basándose en la existencia en estas pacientes de anticuerpos dirigidos contra la tTG, una enzima que participa en los procesos fisiológicos a nivel endometrial tanto durante el ciclo menstrual, la decidualización y la implantación embrionaria (Signorini, Pansini et al. 1988; Kabir-Salmani, Shiokawa et al. 2005).

La tTG ha sido detectada en tejido endometrial normal de origen humano a nivel de la membrana basal del epitelio glandular y de las células estromales circundantes. Un ciclo menstrual normal implica varios procesos biológicos en los cuáles la tTG puede estar directamente involucrada ya sea a través de mecanismos enzimáticos y también de procesos no catalíticos (apoptosis y proliferación celular de la capa funcional del endometrio, angiogénesis y cambios en la MEC endometrial) (Signorini, Pansini et al. 1988; Deng, Shipley et al. 2003; Li, Bagchi et al. 2006); además la tTG parece ser necesaria para la

decidualización inducida por progesterona de las células estromales endometriales (Fujimoto, Kanzaki et al. 1996) uno de los hechos que sugiere que la enzima está involucrada en el proceso de implantación (Kabir-Salmani, Shiokawa et al. 2005).

Por otra parte la tTG está ampliamente expresada en placenta temprana y a término teniendo una importante actividad enzimática a nivel de la membrana de las microvellosidades del sinciotrofoblasto, la interfase primaria entre los tejidos maternos y fetales, donde la misma está expuesta a los anticuerpos maternos circulantes. La tTG placentaria es reconocida por anticuerpos comerciales (Hager, Gliemann et al. 1997; Robinson, Glazier et al. 2006) y por sueros con anticuerpos IgA anti-tTG procedentes de población general celíaca los cuáles son capaces de inhibir su actividad *in situ* (Anjum, Baker et al. 2009)

En base a estos antecedentes avanzamos en el estudio utilizando los sueros de mujeres celíacas con antecedentes de desordenes obstétricos y evaluando su capacidad de reconocer cortes de placenta humana normal a término como un tejido representativo de la interfase materno-fetal.

Siete muestras correspondían a pacientes con antecedentes de abortos tempranos previos al diagnóstico de EC, con el suero de dos de ellas se detectó una importante disminución de la actividad enzimática *in vitro* y se comprobó su reactividad con los cortes de placenta, observándose un patrón de marcado similar al obtenido con el anticuerpo monoclonal contra la tTG 4E1 lo que sugiere que la señal obtenida con los sueros de las pacientes corresponde a reconocimiento de la tTG.

De esta manera probamos por primera vez que los sueros provenientes de celíacas con antecedentes de abortos tienen la capacidad de reconocer tejido placentario y alterar la actividad de transamidación de la tTG *in vitro*.

Estos resultados apoyan la idea de que la alteración de la función de esta enzima a nivel uterino y de la interfase materno-fetal podría contribuir con la existencia trastornos ginecológicos y obstétricos.

Además de su actividad enzimática la tTG extracelular, a través de su rol como co-receptor para la integrina $\beta 3$, está involucrada en la adhesión y migración

celular a través de su interacción con componentes de la MEC (Akimov and Belkin 2001).

En la mayoría de las pacientes se puede asumir indirectamente la presencia de anticuerpos dirigidos contra la zona de interacción entre la tTG y la FN ya que la reactividad de los sueros contra la enzima decrece cuando son enfrentados a la misma unida a FN, aunque estos resultados no se correlacionan con ningún perfil clínico en particular, en algunos pacientes es posible que los anticuerpos anti-tTG puedan contribuir a las alteraciones observadas alterando procesos como la migración celular y la remodelación tisular los cuáles son claves en el proceso de implantación.

Los desórdenes ginecológicos y obstétricos tienen un origen multifactorial, deficiencias nutricionales, desbalances hormonales así como otras alteraciones autoinmunes pueden contribuir a la aparición de alteraciones como las observadas en las pacientes de nuestro grupo de estudio; de hecho el hipotiroidismo no tratado puede causar problemas en el ciclo menstrual, infertilidad y afectar el normal desarrollo de la gestación (Wier and Farley 2006).

En nuestro grupo de estudio diez pacientes tenían antecedentes de hipotiroidismo clínico de las cuáles cuatro además poseían historia de trastornos gineco-obstétricos, por lo tanto no se puede descartar que este trastorno endocrinológico contribuyera a los problemas del área ginecológica observados en estos casos particulares.

Por otra parte, la tTG se encuentra también a nivel tiroideo y se sugiere que la EC puede ser un factor que favorezca la aparición de la patología autoinmune tiroidea vía autoanticuerpos dado que los pacientes que poseen la patología mencionada anteriormente además de EC experimentan una mejoría del desorden endocrinológico cuando adhieren a la dieta libre de gluten (Sategna-Guidetti, Volta et al. 2001; Mainardi, Montanelli et al. 2002)

En este contexto, quisimos explorar si las manifestaciones tiroideas podrían deberse a la presencia de autoanticuerpos clásicamente asociados a hipotiroidismo como los anti-TPO encontrando dichos anticuerpos en una sola de las pacientes con antecedentes de hipotiroidismo; sorprendentemente

encontramos además que los sueros de diez pacientes celíacos con anticuerpos IgA anti-tTG, sin anticuerpos anti-TPO, eran capaces de reconocer cortes de tiroides obteniéndose señal a nivel de las células foliculares así como también en los espacios interfoliculares y la MEC.

Este es un patrón de marcado muy similar al obtenido con un anticuerpo monoclonal comercial específico para la enzima lo que sugiere que el autoantígeno reconocido por los sueros de estas pacientes a nivel de los cortes de tiroides podría ser la tTG.

Cabe destacar que de estas 10 pacientes, 2 presentaban síntomas de disfunción tiroidea y además complicaciones gineco-obstétricas.

Estos hallazgos plantean la interrogante de si los anticuerpos anti-tTG podrían tener que ver con las alteraciones tiroideas y por esto es que consideramos que la evaluación de la función de esta glándula es importante en todos los pacientes celíacos.

Las principales conclusiones de esta primera etapa del trabajo de tesis son que existe una correlación significativa entre la capacidad de los sueros de las pacientes de inhibir la actividad enzimática de transamidación y la presencia de complicaciones ginecológicas y obstétricas durante la EC activa y que además los anticuerpos anti-tTG de estas pacientes son capaces de reconocer a la enzima en diferentes tejidos lo cual apoya la hipótesis de que estos pueden contribuir a la aparición de las manifestaciones extradigestivas de la enfermedad, en particular las vinculadas a complicaciones gineco-obstétricas.

La segunda parte de este trabajo se focalizó en estudiar los efectos de los autoanticuerpos dirigidos contra la tTG en varios procesos involucrados en la implantación (migración y proliferación de células trofoblásticas) y en la homeostasis a nivel de la interfase materno-fetal (clearance de cuerpos apoptóticos) en los que la tTG del compartimiento extracelular estaría implicada. Dado que la tTG se localiza a nivel de las microvellosidades sincitiales de la placenta humana (Anjum, Baker et al. 2009) utilizamos la línea celular Swan-71 como modelo y describimos por primera vez la expresión a nivel superficial de la

enzima en estas células por técnicas de inmunomarcado utilizando un anticuerpo comercial específico demostrando su potencialidad de ser blanco de los anticuerpos producidos por mujeres celíacas.

La implantación exitosa del trofoblasto depende de su capacidad para proliferar, migrar y de la regulación de su capacidad invasiva, atribuible en parte a la producción de metaloproteinasas como la MMP-2, en una forma estrictamente controlada en el espacio y el tiempo (Cohen and Bischof 2007).

En nuestro trabajo analizamos los efectos de los sueros de pacientes celíacas sobre un ensayo de "scratch" en el cual están implicados estos procesos celulares utilizando la línea Swan-71; pudimos observar que los sueros de las pacientes provocaron un retraso en el cerrado del corte generado en la monocapa celular. Para discriminar si la migración y/o la proliferación celular fueron alteradas se analizó el efecto de los anticuerpos anti-tTG en los dos ensayos independientes de proliferación y migración en sistema de transwell constatando que ambos procesos podrían contribuir a los efectos observados en el ensayo de scratch, aunque en el plazo de 8 hs en que se realizó la lectura de éste el efecto sobre la migración sería mas relevante.

Resulta interesante vincular estos resultados con los efectos observados *in vitro* en el ELISA en el cual se enfrentaron los sueros a la tTG unida a FN, con el cuál indirectamente se evaluó la presencia de anticuerpos con especificidades dirigidas al sitio de interacción entre ambas moléculas, lo cual es un proceso central en la adhesión y remodelado de la matriz extracelular. Los resultados del ensayo de scratch son consistentes con el hecho de que 4 de los 5 sueros representativos utilizados, habían presentado una reactividad disminuida cuando la tTG estaba interactuando con FN en comparación a la tTG unida directamente al soporte, en ambos casos en presencia de calcio que asegura una conformación abierta de la enzima, con el sitio catalítico expuesto.

La angiogénesis es central en el proceso de decidualización y placentación por ello gran parte de la investigación sobre el rol patogénico de los anticuerpos anti-tTG está orientad hacia este proceso. Trabajos muy recientes (Di Simone, De

Spirito et al. 2013; Kalliokoski, Sulic et al. 2013) muestran que los anticuerpos de pacientes celíacos interfieren con el proceso de angiogénesis en diversos modelos (*in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*); los autoanticuerpos afectan la dinámica y funcionalidad de las células endoteliales, concretamente interfiriendo con los procesos de migración y degradación de la matriz extracelular. Algunos de los mecanismos subyacentes propuestos implican la inhibición de la secreción de MMP-2 por las células endoteliales, la organización de las fibras de actina y la señalización por las quinasas ERKs y FAK involucradas en la diferenciación de las células endoteliales y migración intracelular.

Si bien nosotros no analizamos los efectos sobre células endoteliales, la disminución de la migración observada en los ensayos en transwell es consistente con datos recientes sobre el efecto de estos autoanticuerpos sobre la migración de células endoteliales al distorsionar la organización de las fibras de actina y la producción de MMP-2 (Di Simone, De Spirito et al. 2013) y no es posible descartar que las MMP-2 también contribuyan con los resultados obtenidos en nuestros ensayos de scratch ya que se ha reportado la producción de MMP-2 en cultivos *in vitro* de Swan-71 (Furmento, Marino et al. 2014).

Por otra parte, los sueros de las pacientes celíacas no solo disminuyeron la proliferación de las células trofoblásticas sino que también promovieron la apoptosis de las mismas. Estos datos van en la misma línea con los de trabajos previos que utilizaron como modelo cultivos primarios de placenta (Di Simone, Silano et al. 2010), aunque no se han propuesto posibles mecanismos subyacentes. Nosotros consideramos que una explicación podría ser por la interferencia con la adhesión de las células a la MEC (al interferir con la interacción integrinas-FN mediada por la tTG) lo cuál podría desencadenar anoikis y en relación a las vías de señalización involucradas, se ha visto a nivel neuronal que estos anticuerpos promueven la apoptosis mediante activación de la vía mitocondrial (Cervio, Volta et al. 2007).

Se ha visto que los anticuerpos anti-fosfolípidos unidos a las células apoptóticas pueden unirse a receptores Fc expresados en la superficie de los macrófagos provocando la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α (Manfredi,

Rovere et al. 1998) y que el nivel elevado de dichas citoquinas incrementa la expresión de Fas y potencia la sensibilidad del trofoblasto a la apoptosis mediada por esta molécula (Aschkenazi, Straszewski et al. 2002; Neale, Demasio et al. 2003), por lo que no es posible descartar este mecanismo en la inducción de la apoptosis por parte de los anti-tTG en la interfase materno-fetal, aunque en nuestro caso los efectos fueron inducidos principalmente en sueros que solo tenían anticuerpos de isotipo IgA específicos para la tTG.

La etapa siguiente de nuestro trabajo fue explorar además cuáles podrían ser las consecuencias de la acumulación de células trofoblásticas apoptóticas, inducidas por los anticuerpos específicos.

Bajo condiciones normales las células apoptóticas son rápidamente removidas por macrófagos maternos en etapas tempranas de la gestación. La fagocitosis de las mismas promueve la liberación *in vitro* de mediadores anti-inflamatorios como IL-10, TGF- β 1 y prostaglandinas (Nagamatsu and Schust 2010; Ambarus, Krausz et al. 2012; Mantovani, Biswas et al. 2013) además este reconocimiento suprime activamente también *in vitro* la liberación de citoquinas inflamatorias (Elliott and Ravichandran 2010).

Por lo tanto, el clearance ineficiente de células trofoblásticas apoptóticas podría promover una desregulación en la respuesta inmune materna a nivel de la interfase materno-fetal lo que condicionaría la eficiencia de los efectos inmunoreguladores.

La inflamación en esta interfase como efecto patológico final se reporta en muchos casos de pérdidas de embarazos, incluidos aquellos de etiología desconocida (Weiss, Goldsmith et al. 2009; Fraccaroli, Grasso et al. 2012), y podría vincularse a niveles aumentados de apoptosis y clearance ineficiente.

Se ha visto un importante incremento de apoptosis del trofoblasto extra-vellositario invasor en situaciones de pre-eclampsia, IUGR y abortos espontáneos por lo que se plantea que esto puede contribuir a la fisiopatología de estas complicaciones de la gestación (DiFederico, Genbacev et al. 1999; Hadziselimovic, Geneto et al. 2007; Minas, Jeschke et al. 2007). En particular, en

lo que respecta a nuestra línea de trabajo se ha descrito el aumento de la inflamación y de la tasa de apoptosis del EVT en las placentas de pacientes celíacas no tratadas cuyos hijos presentaron bajo peso al nacer (Hadziselimovic, Geneto et al. 2007).

Es en este contexto, nos focalizamos en el clearance de la células apoptóticas y planteamos que la tTG expresada en la superficie de los fagocitos presentes a nivel de la interfase materno-fetal podría también ser blanco de los autoanticuerpos basándonos en la función de la tTG en el clearance de los cuerpos apoptóticos (Toth, Garabuczi et al. 2009) y en los trabajos realizados en los modelos de ratones knockout para tTG que revelan que la capacidad fagocítica de los macrófagos procedentes de estos animales se ve alterada (Szondy, Sarang et al. 2003; Falasca, Iadevaia et al. 2005).

Utilizamos la línea celular THP-1 tratada con PMA como modelo celular representativo de los macrófagos maternos y con ella observamos un promedio de 18% de reducción de la tasa de fagocitosis de células trofoblásticas apoptóticas y una disminución estadísticamente significativa de la producción de IL-10 y TGF- β 1 en los ensayos en los que usamos sueros procedentes de celíacas comparado con los resultados obtenidos con los sueros procedentes de las mujeres sanas.

Para abordar el objetivo 4 y explorar en mayor profundidad los posibles mecanismos moleculares involucrados en la interferencia en el proceso de fagocitosis nos centramos en la tTG como molécula que establece un puente con MFG-E8 en la superficie celular (Toth, Garabuczi et al. 2009) dado que esta es una las moléculas más estudiadas de las que median el proceso de fagocitosis (Fuller and Van Eldik 2008). Se ha observado que MFG-E8 se expresa a nivel del trofoblasto (Bocca, Anderson et al. 2012) y que es producido por células apoptóticas endoteliales (Brissette, Lepage et al. 2012) y también se ha descrito su producción por parte de macrófagos y otra células fagocíticas (Miyasaka, Hanayama et al. 2004).

En primera instancia analizamos la producción de MFG-E8 en cultivos derivados de THP-1 diferenciadas y de las Swan-71 apoptóticas constatando que ambos tipos celulares lo producen.

A continuación exploramos la potencialidad de los anticuerpos anti-tTG de interferir con la unión entre la enzima y MFG-E8 en un inmunoensayo; nuestros resultados muestran que la interacción entre ambas proteínas disminuyó en presencia de un anticuerpo anti-tTG policlonal, lo cuál podría generar una disminución en la fagocitosis de las células trofoblásticas apoptóticas si tal interacción ocurriera con la conformación de la tTG extracelular que participa en el proceso de clearance (Szondy, Korponay-Szabo et al. 2011).

Constatamos además que disminuye la concentración de MFG-E8 en los sobrenadantes de los ensayos de fagocitosis en presencia de sueros de pacientes celíacos comparado con lo que sucede en presencia de los sueros normales, lo que podría explicarse por un mayor reclutamiento de esta molécula a nivel de la superficie celular al aumentar la cantidad de células trofoblásticas apoptóticas en presencia de los anticuerpos anti-tTG.

La modulación por citoquinas del proceso de fagocitosis también podría estar afectada dado que el ambiente inmunoregulador generado por los macrófagos podría estar afectado también por la menor producción de TGF- β 1 e IL-10 (Sarang, Toth et al. 2009). El modelo de células trofoblásticas que utilizamos en nuestro trabajo también se ha utilizado en trabajos previos para analizar defectos en la inmunoregulación, se constató que PBMC obtenidos de pacientes con pérdidas recurrentes de embarazos de causa inmunológica mostraban una exagerada respuesta inmune pro-inflamatoria y mediada por LT Th1 luego de haber estado en contacto con las Swan-71 lo que se reflejó en un aumento en la expresión de T-bet y la producción de nitritos mientras se daba una disminución en la producción de TGF- β 1 e IL-10 (Fraccaroli, Grasso et al. 2012).

La disminución de la actividad de TGF- β 1 es uno de los factores que se ha vinculado al desarrollo de autoinmunidad; en ausencia de TGF- β 1 se afecta la diferenciación de células T reguladoras las cuáles son claves en inhibir el desarrollo de autoinmunidad contra un antígeno dado y se perpetua la inflamación mediada por macrófagos al mantener un fenotipo inflamatorio (Vila, Isaacs et al. 2009).

La vinculación entre la tTG y el TGF- β 1 es compleja e interesante; la expresión de la tTG es inducida por esta citoquina en los macrófagos y células apoptóticas (Szondy, Korponay-Szabo et al. 2011) y por otra parte, la tTG de superficie contribuye a la activación del TGF- β 1 mediando su entrecruzamiento a la MEC, a través de Latent TGF Binding Protein-1 (LTBP-1) (Verderio, Gaudry et al. 1999) y de hecho los macrófagos procedentes de ratones tTG $-/-$ no son capaces de producir TGF- β 1 activo (Szondy, Sarang et al. 2003).

Por lo tanto, la menor producción de TGF- β 1 en los ensayos de fagocitosis en presencia de anticuerpos anti-tTG podría deberse en parte a la interferencia con el proceso de entrecruzamiento de esta citoquina a la MEC para su posterior activación. En este aspecto se está profundizando mediante la estandarización de un ensayo para detectar el efecto de los anti-tTG en el entrecruzamiento de LTBP-1 a la MEC. Por otra parte, no es posible descartar un efecto indirecto porque podría ser modulada negativamente la expresión de tTG superficial por los niveles menores de TGF- β 1.

La menor producción de IL-10 observada podría deberse también a la menor producción de TGF- β 1 mediante un efecto indirecto relacionado con una disminución en la diferenciación de los macrófagos en el perfil regulador productor de dichas citoquinas.

En esta etapa del trabajo analizamos efectos de los sueros atribuibles a la presencia de anticuerpos específicos contra la tTG. Se mantiene abierta la pregunta si tales mecanismos ocurren *in vivo*; si bien se ha encontrado depósito de autoanticuerpos en diversos órganos donde hay una expresión intensa de tTG (Korponay-Szabo, Halttunen et al. 2004; Sategna-Guidetti, Franco et al. 2004; Hadjivassiliou, Maki et al. 2006) no se dispone de un modelo *in vivo* de EC para realizar un análisis más fisiológico. En relación a los efectos en la interfase materno-fetal, se ha reportado el depósito de anticuerpos IgA en placentas a término en dos mujeres celíacas con enfermedad activa, en particular en las vellosidades coriónicas y arterias deciduales. Estos anticuerpos fueron eluidos de la placenta y presentaron un patrón de especificidad fina similar a los anticuerpos séricos, los cuales mostraron efectos anti angiogénicos en modelos

in vitro. Además, en los casos de mujeres con IgG específica, también se han detectado estos anticuerpos en el suero y en el cordón umbilical de los recién nacidos y las células endoteliales purificadas del cordón mostraron alteraciones estructurales similares a las observadas en las células HUVEC enfrentadas a los anti-tTG (Simon-Vecsei, Kiraly et al. 2012).

Nosotros nos propusimos aproximarnos a una situación *in vivo* que nos permitiera analizar el tropismo de los anticuerpos en condiciones de gestación así como algunas de sus propiedades funcionales analizadas en los sistemas de cultivo *in vitro* con células de origen humano, particularmente en relación a la actividad de transamidación y los efectos sobre el clearance de cuerpos apoptóticos.

Para esto nos basamos en un trabajo previo que reportó la producción espontánea (independiente del gluten) de anticuerpos anti-tTG en los ratones NOD, los cuáles tienen problemas durante la gestación temprana en el estadio pre-diabético, verificando en primera instancia que éstos son mayoritariamente de isotipo IgG.

Un hallazgo muy significativo fue que los niveles de los anticuerpos IgG anti-tTG disminuyen durante la gestación y que los sueros de los ratones NOD afectan la actividad de transamidación de la tTG, en forma similar a lo observado con los sueros de las pacientes celíacas con trastornos gineco-obstétricos.

La disminución de la cantidad de los anticuerpos específicos circulantes podría interpretarse como una consecuencia de la retención de los mismos en el útero, en el cual pudimos demostrar la expresión de la tTG en cortes que involucran a los sitios de implantación. Si bien intentamos evidenciar el inmunomarcado de la tTG uterina con los sueros de los ratones, no fue posible obtener una señal suficientemente contundente con la metodología utilizada, tal vez debido a la pérdida de epítopes conformacionales por el tratamiento del tejido para la obtención de los bloques de parafina y/o a la afinidad moderada-baja de los anticuerpos anti tTG producidos espontáneamente en los ratones NOD. También es posible que parte de la tTG expresada en el tejido ya esté unida a los

anticuerpos producidos y retenidos *in vivo* y haya menor disponibilidad de los epítopes involucrados para su detección en el inmunomarcado, de hecho el marcado no fue igualmente eficiente con varios AcMo utilizados durante la estandarización de la metodología.

El hecho de que la tTG expresada en las estructuras endometriales sea reconocida por autoanticuerpos específicos puede tener implicaciones en la evolución de la preñez. La disminución del título de los anticuerpos anti-tTG en el suero de las ratonas NOD en el día 9 de la gestación sugiere un reconocimiento rápido *in vivo* de la enzima por los mismos y por lo tanto una depuración de los mismos de la circulación. El hecho de que los autoanticuerpos sean retenidos *in vivo* en tejidos periféricos con una intensa expresión de tTG es sugerido por varios autores, y se especula que la existencia de individuos celíacos seronegativos para tTG podría explicarse por la presencia de anticuerpos de alta avidéz que serían retenidos casi en su totalidad en los tejidos, de forma tal que los niveles séricos podrían ser indetectables (Simon-Vecsei, Kiraly et al. 2012).

Los estudios de inmunohistoquímica indicaron una expresión de tTG fundamentalmente a nivel de las glándulas uterinas y de células del estroma pero no se descarta la unión de los anticuerpos a células del sistema inmune presentes en la interfase como los macrófagos aunque esto no se pudo dilucidar con la técnica utilizada. Interesantemente detectamos una expresión significativamente mayor de la tTG en los macrófagos de las hembras NOD preñadas comparada con la de los animales no preñados y una inhibición de la fagocitosis de células apoptóticas por macrófagos de NOD preñadas.

La inhibición de la fagocitosis de células apoptóticas ejercida por los anticuerpos anti-tTG sobre los macrófagos de NOD preñadas que mostramos en este trabajo apoya el rol patogénico de estos anticuerpos durante la preñez temprana y es coincidente con los resultados descritos anteriormente en el modelo que implica células humanas a pesar de las diferencias en los isotipos mayoritarios de anti-tTG presentes en las muestras humanas y de ratón.

Por otra parte, la evidencia de que la tTG está aumentada en hembras preñadas en comparación con las no preñadas sugiere que probablemente la tTG de los macrófagos esté involucrada en diferentes procesos que ocurren a nivel de la interfase materno-fetal además del clearance de cuerpos apoptóticos.

De hecho, nuestros resultados son consistentes con observaciones previas de aumento de la expresión de la tTG durante la diferenciación de los macrófagos. En estos estudios se ha visto que la tTG se acumula rápida y reversiblemente en macrófagos peritoneales de ratones cultivados en presencia de suero o plasma murino o previamente estimulados *in vivo* con tioglicolato pero no cuando fueron tratados con estímulos pro-inflamatorios bacterianos (Murtaugh, Mehta et al. 1983).

Interesantemente, la expresión de tTG claramente aumentada en los macrófagos durante la diferenciación a partir de monocitos (Murtaugh, Mehta et al. 1983; Mehta, Lopez-Berestein et al. 1985) y sus efectos han sido asociados con un aumento de la migración sobre FN (Mehta, Lopez-Berestein et al. 1985; Akimov and Belkin 2001), consistentemente se ha detectado que la disminución de la expresión de tTG y su inhibición funcional por anticuerpos bloqueantes provocaron una disminución de la adhesión y migración de células monocíticas así como una reducción de la migración de células mieloides (Akimov and Belkin 2001)

Es probable que más de uno de estos mecanismos pueda estar operando *in vivo* durante la etapa temprana de la gestación de los NOD, en particular podría jugar un rol importante el bloqueo por parte de los anticuerpos anti-tTG de la adecuada formación de los portales fagocíticos en los macrófagos.

Además, el hecho de que existe un nivel constante de aproximadamente 20-30 % de macrófagos en la decidua y que esto depende de que exista una permanente migración de monocitos desde la circulación al útero preñado donde se diferencian a macrófagos (Fest, Aldo et al. 2007; Mor and Cardenas 2010) y considerando el aumento reportado de la expresión de la tTG durante la diferenciación de monocito a macrófago, la expresión aumentada de la tTG en los macrófagos de las ratones NOD observada en nuestro trabajo podría reflejar un estado de activación asociado a la gestación.

Creemos que nuestros resultados proporcionan nueva evidencia que permite sostener una posible relación entre la presencia de anticuerpos anti-tTG y los problemas de gestación observados en estos animales; si bien los defectos reportados en la cepa NOD tienen un origen multifactorial consideramos que los anticuerpos anti-tTG pueden contribuir como un componente adicional con efectos consistentes con los observados en los modelos *in vitro* de células humanas.

Conclusiones generales y Perspectivas

Los resultados presentados en este trabajo proporcionan datos experimentales que apoyan un rol patogénico de los anticuerpos anti-tTG a nivel de la interfase materno-fetal al inhibir la migración y proliferación de las células trofoblásticas, promover su apoptosis e interferir con el clearance a través de un mecanismo que podría involucrar la interacción de la enzima con MFG-E8 y/o la producción de TGF- β 1 biológicamente activo. Esta evidencia muestra que estos anticuerpos no solo contribuyen directamente al daño del tejido trofoblástico sino que también interfieren con el microambiente regulatorio necesario para el normal desarrollo del embarazo.

Los datos aportados apoyarían el concepto propuesto por algunos autores sobre la pertinencia de investigar la presencia de Enfermedad Celíaca en mujeres con antecedentes de trastornos gineco-obstétricos, ya que en caso de confirmarse la enfermedad podría eliminarse al menos uno de los factores patogénicos implicados desde la etapa de preconcepción al adherirse a una dieta libre de gluten y eliminar en un período de varios meses los autoanticuerpos circulantes.

Un desafío a futuro será la dilucidación de los epítopes involucrados en la acción biológica de los anti-tTG ya que esto permitiría implementar estrategias de bloqueo de los efectos mediante la administración de péptidos sintéticos que mimeticen dichos epítopes en los casos de mujeres que cursan el embarazo con autoanticuerpos circulantes.

Bibliografía

- Abrahams, V. M., Y. M. Kim, et al. (2004). "Macrophages and apoptotic cell clearance during pregnancy." *Am J Reprod Immunol* **51**(4): 275-282.
- Abrahams, V. M., I. Visintin, et al. (2005). "A role for TLRs in the regulation of immune cell migration by first trimester trophoblast cells." *J Immunol* **175**(12): 8096-8104.
- Aeschlimann, D. and V. Thomazy (2000). "Protein crosslinking in assembly and remodelling of extracellular matrices: the role of transglutaminases." *Connect Tissue Res* **41**(1): 1-27.
- Akimov, S. S. and A. M. Belkin (2001). "Cell-surface transglutaminase promotes fibronectin assembly via interaction with the gelatin-binding domain of fibronectin: a role in TGFbeta-dependent matrix deposition." *J Cell Sci* **114**(Pt 16): 2989-3000.
- Akimov, S. S. and A. M. Belkin (2001). "Cell surface tissue transglutaminase is involved in adhesion and migration of monocytic cells on fibronectin." *Blood* **98**(5): 1567-1576.
- Akimov, S. S., D. Krylov, et al. (2000). "Tissue transglutaminase is an integrin-binding adhesion coreceptor for fibronectin." *J Cell Biol* **148**(4): 825-838.
- Alaedini, A. and P. H. Green (2005). "Narrative review: celiac disease: understanding a complex autoimmune disorder." *Ann Intern Med* **142**(4): 289-298.
- Alaedini, A. and P. H. Green (2008). "Autoantibodies in celiac disease." *Autoimmunity* **41**(1): 19-26.
- Alaedini, A., Z. Xiang, et al. (2008). "Up-regulation of apoptosis and regeneration genes in the dorsal root ganglia during cisplatin treatment." *Exp Neurol* **210**(2): 368-374.
- Aluvihare, V. R., M. Kallikourdis, et al. (2004). "Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus." *Nat Immunol* **5**(3): 266-271.
- Ambarus, C. A., S. Krausz, et al. (2012). "Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages." *J Immunol Methods* **375**(1-2): 196-206.
- Anderson, R. P., P. Degano, et al. (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**(3): 337-342.
- Anjum, N., P. N. Baker, et al. (2009). "Maternal celiac disease autoantibodies bind directly to syncytiotrophoblast and inhibit placental tissue transglutaminase activity." *Reprod Biol Endocrinol* **7**: 16.
- Arck, P. C. and K. Hecher (2013). "Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health." *Nat Med* **19**(5): 548-556.
- Arentz-Hansen, H., S. N. McAdam, et al. (2002). "Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues." *Gastroenterology* **123**(3): 803-809.
- Aschkenazi, S., S. Straszewski, et al. (2002). "Differential regulation and function of the Fas/Fas ligand system in human trophoblast cells." *Biol Reprod* **66**(6): 1853-1861.
- Bardella, M. T., C. Fredella, et al. (2005). "Gluten intolerance: gender- and age-related differences in symptoms." *Scand J Gastroenterol* **40**(1): 15-19.

- Barone, M. V., I. Caputo, et al. (2007). "Humoral immune response to tissue transglutaminase is related to epithelial cell proliferation in celiac disease." Gastroenterology **132**(4): 1245-1253.
- Belkin, A. M. (2011). "Extracellular TG2: emerging functions and regulation." FEBS J **278**(24): 4704-4716.
- Bentin-Ley, U., A. Sjogren, et al. (1999). "Presence of uterine pinopodes at the embryo-endometrial interface during human implantation in vitro." Hum Reprod **14**(2): 515-520.
- Bershadsky, A., M. Kozlov, et al. (2006). "Adhesion-mediated mechanosensitivity: a time to experiment, and a time to theorize." Curr Opin Cell Biol **18**(5): 472-481.
- Bingley, P. J., A. J. Williams, et al. (2004). "Undiagnosed coeliac disease at age seven: population based prospective birth cohort study." BMJ **328**(7435): 322-323.
- Blanchon, L., P. Sauvant, et al. (2002). "Human choriocarcinoma cell line JEG-3 produces and secretes active retinoids from retinol." Mol Hum Reprod **8**(5): 485-493.
- Bocca, S. M., S. Anderson, et al. (2012). "Milk fat globule epidermal growth factor 8 (MFG-E8): a novel protein in the mammalian endometrium with putative roles in implantation and placentation." Placenta **33**(10): 795-802.
- Boothe, R. L. and J. E. Folk (1969). "A reversible, calcium-dependent, copper-catalyzed inactivation of guinea pig liver transglutaminase." J Biol Chem **244**(2): 399-405.
- Boscolo, S., A. Lorenzon, et al. (2010). "Anti transglutaminase antibodies cause ataxia in mice." PLoS One **5**(3): e9698.
- Briani, C., D. Samaroo, et al. (2008). "Celiac disease: from gluten to autoimmunity." Autoimmun Rev **7**(8): 644-650.
- Brissette, M. J., S. Lepage, et al. (2012). "MFG-E8 released by apoptotic endothelial cells triggers anti-inflammatory macrophage reprogramming." PLoS One **7**(4): e36368.
- Bulmer, J. N. and P. M. Johnson (1984). "Macrophage populations in the human placenta and amniochorion." Clin Exp Immunol **57**(2): 393-403.
- Burke, S. D., H. Dong, et al. (2007). "Aberrant endometrial features of pregnancy in diabetic NOD mice." Diabetes **56**(12): 2919-2926.
- Byrne, G., F. Ryan, et al. (2007). "Mutagenesis of the catalytic triad of tissue transglutaminase abrogates coeliac disease serum IgA autoantibody binding." Gut **56**(3): 336-341.
- Caputo, I., M. V. Barone, et al. (2009). "Tissue transglutaminase in celiac disease: role of autoantibodies." Amino Acids **36**(4): 693-699.
- Caramaschi, P., D. Biasi, et al. (2000). "[Celiac disease and abortion: focusing on a possible relationship]." Recenti Prog Med **91**(2): 72-75.
- Cataldo, F. and G. Montalto (2007). "Celiac disease in the developing countries: a new and challenging public health problem." World J Gastroenterol **13**(15): 2153-2159.
- Cervio, E., U. Volta, et al. (2007). "Sera of patients with celiac disease and neurologic disorders evoke a mitochondrial-dependent apoptosis in vitro." Gastroenterology **133**(1): 195-206.
- Ciacci, C., M. Cirillo, et al. (1996). "Celiac disease and pregnancy outcome." Am J Gastroenterol **91**(4): 718-722.
- Cohen, M. and P. Bischof (2007). "Factors regulating trophoblast invasion." Gynecol Obstet Invest **64**(3): 126-130.
- Colombel, J. F., F. Mascart-Lemone, et al. (1990). "Jejunal immunoglobulin and antigliadin antibody secretion in adult coeliac disease." Gut **31**(12): 1345-1349.
- Collin, P., J. Salmi, et al. (1994). "Autoimmune thyroid disorders and coeliac disease." Eur J Endocrinol **130**(2): 137-140.

- Cordell, P. A., B. T. Kile, et al. (2010). "Association of coagulation factor XIII-A with Golgi proteins within monocyte-macrophages: implications for subcellular trafficking and secretion." Blood **115**(13): 2674-2681.
- Cuoco, L., M. Certo, et al. (1999). "Prevalence and early diagnosis of coeliac disease in autoimmune thyroid disorders." Ital J Gastroenterol Hepatol **31**(4): 283-287.
- Cupurdija, K., D. Azzola, et al. (2004). "Macrophages of human first trimester decidua express markers associated to alternative activation." Am J Reprod Immunol **51**(2): 117-122.
- Chau, D. Y., R. J. Collighan, et al. (2005). "The cellular response to transglutaminase-cross-linked collagen." Biomaterials **26**(33): 6518-6529.
- Chifflet, S., C. Bolatto, et al. (2004). "A rapid method for fibronectin purification on nitrocellulose membranes suitable for tissue culture." J Biochem Biophys Methods **59**(2): 139-143.
- Dardik, R. and A. Inbal (2006). "Complex formation between tissue transglutaminase II (tTG) and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2): proposed mechanism for modulation of endothelial cell response to VEGF." Exp Cell Res **312**(16): 2973-2982.
- Davies, P. J., M. P. Murtaugh, et al. (1985). "Retinoic acid-induced expression of tissue transglutaminase in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells." J Biol Chem **260**(8): 5166-5174.
- De Laurenzi, V. and G. Melino (2001). "Gene disruption of tissue transglutaminase." Mol Cell Biol **21**(1): 148-155.
- Deasey, S., S. Shanmugasundaram, et al. (2013). "Tissue-specific responses to loss of transglutaminase 2." Amino Acids **44**(1): 179-187.
- Dekel, N., Y. Gnainsky, et al. (2010). "Inflammation and implantation." Am J Reprod Immunol **63**(1): 17-21.
- Delaleu, N., C. Q. Nguyen, et al. (2011). "Sjogren's syndrome: studying the disease in mice." Arthritis Res Ther **13**(3): 217.
- Deng, L., G. L. Shipley, et al. (2003). "Coordinate regulation of the production and signaling of retinoic acid by estrogen in the human endometrium." J Clin Endocrinol Metab **88**(5): 2157-2163.
- Di Niro, R., F. Ferrara, et al. (2005). "Characterizing monoclonal antibody epitopes by filtered gene fragment phage display." Biochem J **388**(Pt 3): 889-894.
- Di Niro, R., L. Mesin, et al. (2012). "High abundance of plasma cells secreting transglutaminase 2-specific IgA autoantibodies with limited somatic hypermutation in celiac disease intestinal lesions." Nat Med **18**(3): 441-445.
- Di Sabatino, A., A. Vanoli, et al. (2012). "The function of tissue transglutaminase in celiac disease." Autoimmun Rev **11**(10): 746-753.
- Di Simone, N., M. De Spirito, et al. (2013). "Potential new mechanisms of placental damage in celiac disease: anti-transglutaminase antibodies impair human endometrial angiogenesis." Biol Reprod **89**(4): 88.
- Di Simone, N., M. Silano, et al. (2010). "Anti-tissue transglutaminase antibodies from celiac patients are responsible for trophoblast damage via apoptosis in vitro." Am J Gastroenterol **105**(10): 2254-2261.
- Dieterich, W., T. Ehnis, et al. (1997). "Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease." Nat Med **3**(7): 797-801.
- DiFederico, E., O. Genbacev, et al. (1999). "Preeclampsia is associated with widespread apoptosis of placental cytotrophoblasts within the uterine wall." Am J Pathol **155**(1): 293-301.
- Eckert, R. L., M. T. Kaartinen, et al. (2014). "Transglutaminase regulation of cell function." Physiol Rev **94**(2): 383-417.

- Ehrmann, J., Jr., A. Kolek, et al. (2003). "Immunohistochemical study of the apoptotic mechanisms in the intestinal mucosa during children's coeliac disease." Virchows Arch **442**(5): 453-461.
- Elliott, M. R. and K. S. Ravichandran (2010). "Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease." J Cell Biol **189**(7): 1059-1070.
- Esposito, C., F. Paparo, et al. (2003). "Expression and enzymatic activity of small intestinal tissue transglutaminase in celiac disease." Am J Gastroenterol **98**(8): 1813-1820.
- Fadok, V. A. and G. Chimini (2001). "The phagocytosis of apoptotic cells." Semin Immunol **13**(6): 365-372.
- Falasca, L., V. Iadevaia, et al. (2005). "Transglutaminase type II is a key element in the regulation of the anti-inflammatory response elicited by apoptotic cell engulfment." J Immunol **174**(11): 7330-7340.
- Fasano, A. (2003). "Celiac disease--how to handle a clinical chameleon." N Engl J Med **348**(25): 2568-2570.
- Fasano, A., I. Berti, et al. (2003). "Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study." Arch Intern Med **163**(3): 286-292.
- Fasano, A. and C. Catassi (2012). "Clinical practice. Celiac disease." N Engl J Med **367**(25): 2419-2426.
- Feng, J. F., M. Readon, et al. (1999). "Calreticulin down-regulates both GTP binding and transglutaminase activities of transglutaminase II." Biochemistry **38**(33): 10743-10749.
- Fest, S., P. B. Aldo, et al. (2007). "Trophoblast-macrophage interactions: a regulatory network for the protection of pregnancy." Am J Reprod Immunol **57**(1): 55-66.
- Fesus, L. and M. Piacentini (2002). "Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions." Trends Biochem Sci **27**(10): 534-539.
- Folk, J. E. and P. W. Cole (1966). "Identification of a functional cysteine essential for the activity of guinea pig liver transglutaminase." J Biol Chem **241**(13): 3238-3240.
- Forsprecher, J., Z. Wang, et al. (2009). "Enhanced osteoblast adhesion on transglutaminase 2-crosslinked fibronectin." Amino Acids **36**(4): 747-753.
- Fraccaroli, L., E. Grasso, et al. (2012). "Defects in the vasoactive intestinal peptide (VIP)/VPAC system during early stages of the placental-maternal leucocyte interaction impair the maternal tolerogenic response." Clin Exp Immunol **170**(3): 310-320.
- Fujimoto, M., H. Kanzaki, et al. (1996). "Requirement for transglutaminase in progesterone-induced decidualization of human endometrial stromal cells." Endocrinology **137**(3): 1096-1101.
- Fukuda, K., M. Kojiro, et al. (1994). "Differential regulation of tissue transglutaminase in rat hepatoma cell lines McA-RH7777 and McA-RH8994: relation to growth rate and cell death." J Cell Biochem **54**(1): 67-77.
- Fuller, A. D. and L. J. Van Eldik (2008). "MFG-E8 regulates microglial phagocytosis of apoptotic neurons." J Neuroimmune Pharmacol **3**(4): 246-256.
- Furmento, V. A., J. Marino, et al. (2014). "The granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) upregulates metalloproteinase-2 and VEGF through PI3K/Akt and Erk1/2 activation in human trophoblast Swan 71 cells." Placenta **35**(11): 937-946.
- Garrote, J. A., E. Gomez-Gonzalez, et al. (2008). "Celiac disease pathogenesis: the proinflammatory cytokine network." J Pediatr Gastroenterol Nutr **47** Suppl 1: S27-32.
- Gasbarrini, A., E. S. Torre, et al. (2000). "Recurrent spontaneous abortion and intrauterine fetal growth retardation as symptoms of coeliac disease." Lancet **356**(9227): 399-400.

- Gomez, J. C., G. S. Selvaggio, et al. (2001). "Prevalence of celiac disease in Argentina: screening of an adult population in the La Plata area." Am J Gastroenterol **96**(9): 2700-2704.
- Green, P. H. and C. Cellier (2007). "Celiac disease." N Engl J Med **357**(17): 1731-1743.
- Grenard, P., M. K. Bates, et al. (2001). "Evolution of transglutaminase genes: identification of a transglutaminase gene cluster on human chromosome 15q15. Structure of the gene encoding transglutaminase X and a novel gene family member, transglutaminase Z." J Biol Chem **276**(35): 33066-33078.
- Guerin, L. R., J. R. Prins, et al. (2009). "Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment?" Hum Reprod Update **15**(5): 517-535.
- Guller, S. and L. LaChapelle (1999). "The role of placental Fas ligand in maintaining immune privilege at maternal-fetal interfaces." Semin Reprod Endocrinol **17**(1): 39-44.
- Gundemir, S., G. Colak, et al. (2012). "Transglutaminase 2: a molecular Swiss army knife." Biochim Biophys Acta **1823**(2): 406-419.
- Hadjivassiliou, M., M. Maki, et al. (2006). "Autoantibody targeting of brain and intestinal transglutaminase in gluten ataxia." Neurology **66**(3): 373-377.
- Hadziselimovic, F., R. Geneto, et al. (2007). "Celiac disease, pregnancy, small for gestational age: role of extravillous trophoblast." Fetal Pediatr Pathol **26**(3): 125-134.
- Hager, H., J. Gliemann, et al. (1997). "Developmental regulation of tissue transglutaminase during human placentation and expression in neoplastic trophoblast." J Pathol **181**(1): 106-110.
- Halfdanarson, T. R., M. R. Litzow, et al. (2007). "Hematologic manifestations of celiac disease." Blood **109**(2): 412-421.
- Halttunen, T. and M. Maki (1999). "Serum immunoglobulin A from patients with celiac disease inhibits human T84 intestinal crypt epithelial cell differentiation." Gastroenterology **116**(3): 566-572.
- Hanayama, R., K. Miyasaka, et al. (2006). "MFG-E8-dependent clearance of apoptotic cells, and autoimmunity caused by its failure." Curr Dir Autoimmun **9**: 162-172.
- Hanayama, R., M. Tanaka, et al. (2002). "Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes." Nature **417**(6885): 182-187.
- Hanayama, R., M. Tanaka, et al. (2004). "Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice." Science **304**(5674): 1147-1150.
- Harper, J. W., S. F. Holleran, et al. (2007). "Anemia in celiac disease is multifactorial in etiology." Am J Hematol **82**(11): 996-1000.
- He, Y. Y., M. R. Du, et al. (2007). "Regulation of C-C motif chemokine ligand 2 and its receptor in human decidual stromal cells by pregnancy-associated hormones in early gestation." Hum Reprod **22**(10): 2733-2742.
- Heikkinen, J., M. Mottonen, et al. (2003). "Phenotypic characterization of human decidual macrophages." Clin Exp Immunol **131**(3): 498-505.
- Heldin, C. H. and B. Westermark (1999). "Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor." Physiol Rev **79**(4): 1283-1316.
- Hill, J. A. (1990). "Immunological mechanisms of pregnancy maintenance and failure: a critique of theories and therapy." Am J Reprod Immunol **22**(1-2): 33-41.
- Hodrea, J., M. A. Demeny, et al. (2010). "Transglutaminase 2 is expressed and active on the surface of human monocyte-derived dendritic cells and macrophages." Immunol Lett **130**(1-2): 74-81.
- Hofstra, L. S., A. M. Bos, et al. (2001). "A phase I and pharmacokinetic study of intraperitoneal topotecan." Br J Cancer **85**(11): 1627-1633.
- Holmes, G. K. (2001). "Coeliac disease and Type 1 diabetes mellitus - the case for screening." Diabet Med **18**(3): 169-177.

- Hue, S., J. J. Mention, et al. (2004). "A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease." *Immunity* **21**(3): 367-377.
- Hunt, J. S., L. Miller, et al. (1998). "Hormonal regulation of uterine macrophages." *Dev Immunol* **6**(1-2): 105-110.
- Huynh, M. L., V. A. Fadok, et al. (2002). "Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation." *J Clin Invest* **109**(1): 41-50.
- Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." *Cell* **110**(6): 673-687.
- Ientile, R., D. Caccamo, et al. (2007). "Tissue transglutaminase and the stress response." *Amino Acids* **33**(2): 385-394.
- Iismaa, S. E., B. M. Mearns, et al. (2009). "Transglutaminases and disease: lessons from genetically engineered mouse models and inherited disorders." *Physiol Rev* **89**(3): 991-1023.
- Jabri, B. and L. M. Sollid (2006). "Mechanisms of disease: immunopathogenesis of celiac disease." *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* **3**(9): 516-525.
- Janiak, A., E. A. Zemskov, et al. (2006). "Cell surface transglutaminase promotes RhoA activation via integrin clustering and suppression of the Src-p190RhoGAP signaling pathway." *Mol Biol Cell* **17**(4): 1606-1619.
- Jin, X., J. Stamaes, et al. (2011). "Activation of extracellular transglutaminase 2 by thioredoxin." *J Biol Chem* **286**(43): 37866-37873.
- Jung, S. M., S. Jandu, et al. (2013). "Increased tissue transglutaminase activity contributes to central vascular stiffness in eNOS knockout mice." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **305**(6): H803-810.
- Kabir-Salmani, M., S. Shiokawa, et al. (2005). "Tissue transglutaminase at embryo-maternal interface." *J Clin Endocrinol Metab* **90**(8): 4694-4702.
- Kagnoff, M. F. (2007). "Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease." *J Clin Invest* **117**(1): 41-49.
- Kallikowski, S., S. Caja, et al. (2015). "Injection of celiac disease patient sera or immunoglobulins to mice reproduces a condition mimicking early developing celiac disease." *J Mol Med (Berl)* **93**(1): 51-62.
- Kallikowski, S., A. M. Sulic, et al. (2013). "Celiac Disease-Specific TG2-Targeted Autoantibodies Inhibit Angiogenesis and in Mice by Interfering with Endothelial Cell Dynamics." *PLoS One* **8**(6): e65887.
- Kemppainen, T., H. Kroger, et al. (1999). "Osteoporosis in adult patients with celiac disease." *Bone* **24**(3): 249-255.
- Khashan, A. S., T. B. Henriksen, et al. (2010). "The impact of maternal celiac disease on birthweight and preterm birth: a Danish population-based cohort study." *Hum Reprod* **25**(2): 528-534.
- Kiefte-de Jong, J. C., V. W. Jaddoe, et al. (2013). "Levels of antibodies against tissue transglutaminase during pregnancy are associated with reduced fetal weight and birth weight." *Gastroenterology* **144**(4): 726-735 e722.
- Kiraly, R., Z. Vecsei, et al. (2006). "Coeliac autoantibodies can enhance transamidating and inhibit GTPase activity of tissue transglutaminase: dependence on reaction environment and enzyme fitness." *J Autoimmun* **26**(4): 278-287.
- Korponay-Szabo, I. R., T. Halttunen, et al. (2004). "In vivo targeting of intestinal and extraintestinal transglutaminase 2 by coeliac autoantibodies." *Gut* **53**(5): 641-648.
- Korponay-Szabo, I. R., S. Sulkanen, et al. (2000). "Tissue transglutaminase is the target in both rodent and primate tissues for celiac disease-specific autoantibodies." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **31**(5): 520-527.
- Kumar, A., M. Meena, et al. (2011). "Latent celiac disease in reproductive performance of women." *Fertil Steril* **95**(3): 922-927.

- Kuncio, G. S., M. Tsyganskaya, et al. (1998). "TNF-alpha modulates expression of the tissue transglutaminase gene in liver cells." *Am J Physiol* **274**(2 Pt 1): G240-245.
- Lai, T. S., A. Hausladen, et al. (2001). "Calcium regulates S-nitrosylation, denitrosylation, and activity of tissue transglutaminase." *Biochemistry* **40**(16): 4904-4910.
- Leber, A., A. Teles, et al. (2010). "Regulatory T cells and their role in pregnancy." *Am J Reprod Immunol* **63**(6): 445-459.
- Leiter, E. H. (2001). "The NOD mouse: a model for insulin-dependent diabetes mellitus." *Curr Protoc Immunol* **Chapter 15**: Unit 15 19.
- Li, Q., M. K. Bagchi, et al. (2006). "Identification of a signaling pathway involving progesterone receptor, calcitonin, and tissue transglutaminase in Ishikawa endometrial cells." *Endocrinology* **147**(5): 2147-2154.
- Lindfors, K., K. Kaukinen, et al. (2009). "A role for anti-transglutaminase 2 autoantibodies in the pathogenesis of coeliac disease?" *Amino Acids* **36**(4): 685-691.
- Liu, S., R. A. Cerione, et al. (2002). "Structural basis for the guanine nucleotide-binding activity of tissue transglutaminase and its regulation of transamidation activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(5): 2743-2747.
- Lo, W., K. Sano, et al. (2003). "Changing presentation of adult celiac disease." *Dig Dis Sci* **48**(2): 395-398.
- Lorand, L. and R. M. Graham (2003). "Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(2): 140-156.
- Lu, S., M. Saydak, et al. (1995). "Isolation and characterization of the human tissue transglutaminase gene promoter." *J Biol Chem* **270**(17): 9748-9756.
- Ludvigsson, J. F., S. M. Montgomery, et al. (2005). "Celiac disease and risk of adverse fetal outcome: a population-based cohort study." *Gastroenterology* **129**(2): 454-463.
- Maglio, M., F. Florian, et al. (2009). "Majority of children with type 1 diabetes produce and deposit anti-tissue transglutaminase antibodies in the small intestine." *Diabetes* **58**(7): 1578-1584.
- Mainardi, E., A. Montanelli, et al. (2002). "Thyroid-related autoantibodies and celiac disease: a role for a gluten-free diet?" *J Clin Gastroenterol* **35**(3): 245-248.
- Maiuri, L., C. Ciacci, et al. (2003). "Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease." *Lancet* **362**(9377): 30-37.
- Manfredi, A. A., P. Rovere, et al. (1998). "Apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. I. Opsonization by antiphospholipid antibodies." *Arthritis Rheum* **41**(2): 205-214.
- Mantovani, A., S. K. Biswas, et al. (2013). "Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling." *J Pathol* **229**(2): 176-185.
- Marietta, E., K. Black, et al. (2004). "A new model for dermatitis herpetiformis that uses HLA-DQ8 transgenic NOD mice." *J Clin Invest* **114**(8): 1090-1097.
- Martinelli, P., R. Troncone, et al. (2000). "Coeliac disease and unfavourable outcome of pregnancy." *Gut* **46**(3): 332-335.
- Marzari, R., D. Sblattero, et al. (2001). "Molecular dissection of the tissue transglutaminase autoantibody response in celiac disease." *J Immunol* **166**(6): 4170-4176.
- Matysiak-Budnik, T., C. Candalh, et al. (2003). "Alterations of the intestinal transport and processing of gliadin peptides in celiac disease." *Gastroenterology* **125**(3): 696-707.
- Mehta, K., G. Lopez-Berestein, et al. (1985). "Interferon-gamma requires serum retinoids to promote the expression of tissue transglutaminase in cultured human blood monocytes." *J Immunol* **134**(4): 2053-2056.
- Melino, G. and M. Piacentini (1998). "'Tissue' transglutaminase in cell death: a downstream or a multifunctional upstream effector?" *FEBS Lett* **430**(1-2): 59-63.

- Meloni, G. F., S. Dessole, et al. (1999). "The prevalence of coeliac disease in infertility." Hum Reprod **14**(11): 2759-2761.
- Meresse, B., S. A. Curran, et al. (2006). "Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease." J Exp Med **203**(5): 1343-1355.
- Meresse, B., G. Malamut, et al. (2012). "Celiac disease: an immunological jigsaw." Immunity **36**(6): 907-919.
- Meresse, B., J. Ripoche, et al. (2009). "Celiac disease: from oral tolerance to intestinal inflammation, autoimmunity and lymphomagenesis." Mucosal Immunol **2**(1): 8-23.
- Mesin, L., L. M. Sollid, et al. (2012). "The intestinal B-cell response in celiac disease." Front Immunol **3**: 313.
- Miller, L. and J. S. Hunt (1996). "Sex steroid hormones and macrophage function." Life Sci **59**(1): 1-14.
- Minas, V., U. Jeschke, et al. (2007). "Abortion is associated with increased expression of FasL in decidual leukocytes and apoptosis of extravillous trophoblasts: a role for CRH and urocortin." Mol Hum Reprod **13**(9): 663-673.
- Mishra, S., G. Melino, et al. (2007). "Transglutaminase 2 kinase activity facilitates protein kinase A-induced phosphorylation of retinoblastoma protein." J Biol Chem **282**(25): 18108-18115.
- Mishra, S. and L. J. Murphy (2006). "Phosphorylation of transglutaminase 2 by PKA at Ser216 creates 14-3-3 binding sites." Biochem Biophys Res Commun **347**(4): 1166-1170.
- Miyasaka, K., R. Hanayama, et al. (2004). "Expression of milk fat globule epidermal growth factor 8 in immature dendritic cells for engulfment of apoptotic cells." Eur J Immunol **34**(5): 1414-1422.
- Molteni, N., M. T. Bardella, et al. (1990). "Obstetric and gynecological problems in women with untreated celiac sprue." J Clin Gastroenterol **12**(1): 37-39.
- Mor, G. and V. M. Abrahams (2003). "Potential role of macrophages as immunoregulators of pregnancy." Reprod Biol Endocrinol **1**: 119.
- Mor, G. and I. Cardenas (2010). "The immune system in pregnancy: a unique complexity." Am J Reprod Immunol **63**(6): 425-433.
- Munn, D. H., M. Zhou, et al. (1998). "Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism." Science **281**(5380): 1191-1193.
- Murray, J. A., C. Van Dyke, et al. (2003). "Trends in the identification and clinical features of celiac disease in a North American community, 1950-2001." Clin Gastroenterol Hepatol **1**(1): 19-27.
- Murtaugh, M. P., K. Mehta, et al. (1983). "Induction of tissue transglutaminase in mouse peritoneal macrophages." J Biol Chem **258**(18): 11074-11081.
- Myrsky, E., S. Caja, et al. (2009). "Celiac disease IgA modulates vascular permeability in vitro through the activity of transglutaminase 2 and RhoA." Cell Mol Life Sci **66**(20): 3375-3385.
- Myrsky, E., K. Kaukinen, et al. (2008). "Coeliac disease-specific autoantibodies targeted against transglutaminase 2 disturb angiogenesis." Clin Exp Immunol **152**(1): 111-119.
- Nagamatsu, T. and D. J. Schust (2010). "The contribution of macrophages to normal and pathological pregnancies." Am J Reprod Immunol **63**(6): 460-471.
- Nagy, L., M. Saydak, et al. (1996). "Identification and characterization of a versatile retinoid response element (retinoic acid receptor response element-retinoid X receptor response element) in the mouse tissue transglutaminase gene promoter." J Biol Chem **271**(8): 4355-4365.
- Naiyer, A. J., J. Shah, et al. (2008). "Tissue transglutaminase antibodies in individuals with celiac disease bind to thyroid follicles and extracellular matrix and may contribute to thyroid dysfunction." Thyroid **18**(11): 1171-1178.

- Nakachi, K., M. Powell, et al. (2004). "Epitopes recognised by tissue transglutaminase antibodies in coeliac disease." J Autoimmun **22**(1): 53-63.
- Nanda, N., S. E. Iismaa, et al. (2001). "Targeted inactivation of Gh/tissue transglutaminase II." J Biol Chem **276**(23): 20673-20678.
- Neale, D., K. Demasio, et al. (2003). "Maternal serum of women with pre-eclampsia reduces trophoblast cell viability: evidence for an increased sensitivity to Fas-mediated apoptosis." J Matern Fetal Neonatal Med **13**(1): 39-44.
- Nelea, V., Y. Nakano, et al. (2008). "Size distribution and molecular associations of plasma fibronectin and fibronectin crosslinked by transglutaminase 2." Protein J **27**(4): 223-233.
- Norwitz, E. R., D. J. Schust, et al. (2001). "Implantation and the survival of early pregnancy." N Engl J Med **345**(19): 1400-1408.
- Nunes, I., P. E. Gleizes, et al. (1997). "Latent transforming growth factor-beta binding protein domains involved in activation and transglutaminase-dependent cross-linking of latent transforming growth factor-beta." J Cell Biol **136**(5): 1151-1163.
- Ogasawara, M., K. Aoki, et al. (1999). "Prevalence of autoantibodies in patients with recurrent miscarriages." Am J Reprod Immunol **41**(1): 86-90.
- Ozgor, B. and M. A. Selimoglu (2010). "Coeliac disease and reproductive disorders." Scand J Gastroenterol **45**(4): 395-402.
- Park, D., S. S. Choi, et al. (2010). "Transglutaminase 2: a multi-functional protein in multiple subcellular compartments." Amino Acids **39**(3): 619-631.
- Parsons, M., M. D. Keppler, et al. (2002). "Site-directed perturbation of protein kinase C-integrin interaction blocks carcinoma cell chemotaxis." Mol Cell Biol **22**(16): 5897-5911.
- Petroff, M. G., L. Chen, et al. (2002). "B7 family molecules: novel immunomodulators at the maternal-fetal interface." Placenta **23 Suppl A**: S95-101.
- Petroff, M. G., P. Sedlmayr, et al. (2002). "Decidual macrophages are potentially susceptible to inhibition by class Ia and class Ib HLA molecules." J Reprod Immunol **56**(1-2): 3-17.
- Piacentini, M., M. P. Ceru, et al. (1992). "In vivo and in vitro induction of 'tissue' transglutaminase in rat hepatocytes by retinoic acid." Biochim Biophys Acta **1135**(2): 171-179.
- Pinkas, D. M., P. Strop, et al. (2007). "Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation." PLoS Biol **5**(12): e327.
- Pratesi, R., L. Gandolfi, et al. (2003). "Prevalence of coeliac disease: unexplained age-related variation in the same population." Scand J Gastroenterol **38**(7): 747-750.
- Priglinger, S. G., C. S. Alge, et al. (2004). "TGF-beta2-induced cell surface tissue transglutaminase increases adhesion and migration of RPE cells on fibronectin through the gelatin-binding domain." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(3): 955-963.
- Ramhorst, R., L. Fraccaroli, et al. (2012). "Modulation and recruitment of inducible regulatory T cells by first trimester trophoblast cells." Am J Reprod Immunol **67**(1): 17-27.
- Ransford, R. A., M. Hayes, et al. (2002). "A controlled, prospective screening study of celiac disease presenting as iron deficiency anemia." J Clin Gastroenterol **35**(3): 228-233.
- Reister, F., H. G. Frank, et al. (1999). "The distribution of macrophages in spiral arteries of the placental bed in pre-eclampsia differs from that in healthy patients." Placenta **20**(2-3): 229-233.
- Reister, F., H. G. Frank, et al. (2001). "Macrophage-induced apoptosis limits endovascular trophoblast invasion in the uterine wall of preeclamptic women." Lab Invest **81**(8): 1143-1152.

- Remes-Troche, J. M., A. Rios-Vaca, et al. (2008). "High prevalence of celiac disease in Mexican Mestizo adults with type 1 diabetes mellitus." J Clin Gastroenterol **42**(5): 460-465.
- Ritter, S. J. and P. J. Davies (1998). "Identification of a transforming growth factor-beta1/bone morphogenetic protein 4 (TGF-beta1/BMP4) response element within the mouse tissue transglutaminase gene promoter." J Biol Chem **273**(21): 12798-12806.
- Robinson, N. J., P. N. Baker, et al. (2007). "A role for tissue transglutaminase in stabilization of membrane-cytoskeletal particles shed from the human placenta." Biol Reprod **77**(4): 648-657.
- Robinson, N. J., J. D. Glazier, et al. (2006). "Tissue transglutaminase expression and activity in placenta." Placenta **27**(2-3): 148-157.
- Roca, V., M. Calafat, et al. (2009). "Potential immunomodulatory role of VIP in the implantation sites of prediabetic nonobese diabetic mice." Reproduction **138**(4): 733-742.
- Rostami, K., E. A. Steegers, et al. (2001). "Coeliac disease and reproductive disorders: a neglected association." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **96**(2): 146-149.
- Rostom, A., C. Dube, et al. (2005). "The diagnostic accuracy of serologic tests for celiac disease: a systematic review." Gastroenterology **128**(4 Suppl 1): S38-46.
- Ruiz, J. E., J. Cubillos, et al. (1995). "Autoantibodies to phospholipids and nuclear antigens in non-pregnant and pregnant Colombian women with recurrent spontaneous abortions." J Reprod Immunol **28**(1): 41-51.
- Saito, S., A. Nakashima, et al. (2010). "Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy." Am J Reprod Immunol **63**(6): 601-610.
- Salmi, T. T., P. Collin, et al. (2006). "Immunoglobulin A autoantibodies against transglutaminase 2 in the small intestinal mucosa predict forthcoming coeliac disease." Aliment Pharmacol Ther **24**(3): 541-552.
- Santhanam, L., E. C. Tuday, et al. (2010). "Decreased S-nitrosylation of tissue transglutaminase contributes to age-related increases in vascular stiffness." Circ Res **107**(1): 117-125.
- Sarang, Z., B. Toth, et al. (2009). "Some lessons from the tissue transglutaminase knockout mouse." Amino Acids **36**(4): 625-631.
- Sarkar, N. K., D. D. Clarke, et al. (1957). "An enzymically catalyzed incorporation of amines into proteins." Biochim Biophys Acta **25**(2): 451-452.
- Sategna-Guidetti, C., E. Franco, et al. (2004). "Binding by serum IgA antibodies from patients with coeliac disease to monkey heart tissue." Scand J Gastroenterol **39**(6): 540-543.
- Sategna-Guidetti, C., U. Volta, et al. (2001). "Prevalence of thyroid disorders in untreated adult celiac disease patients and effect of gluten withdrawal: an Italian multicenter study." Am J Gastroenterol **96**(3): 751-757.
- Sblattero, D., F. Florian, et al. (2002). "The analysis of the fine specificity of celiac disease antibodies using tissue transglutaminase fragments." Eur J Biochem **269**(21): 5175-5181.
- Sblattero, D., F. Maurano, et al. (2005). "Characterization of the anti-tissue transglutaminase antibody response in nonobese diabetic mice." J Immunol **174**(9): 5830-5836.
- Scarpellini, A., R. Germack, et al. (2009). "Heparan sulfate proteoglycans are receptors for the cell-surface trafficking and biological activity of transglutaminase-2." J Biol Chem **284**(27): 18411-18423.
- Seissler, J., U. Wöhrle, et al. (2001). "Autoantibodies from patients with coeliac disease recognize distinct functional domains of the autoantigen tissue transglutaminase." Clin Exp Immunol **125**(2): 216-221.

- Shan, L., O. Molberg, et al. (2002). "Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue." *Science* **297**(5590): 2275-2279.
- Sharkey, A. M., P. P. Jokhi, et al. (1994). "Expression of c-kit and kit ligand at the human maternofetal interface." *Cytokine* **6**(2): 195-205.
- Shewry, P. R. and N. G. Halford (2002). "Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization." *J Exp Bot* **53**(370): 947-958.
- Signorini, M., F. Pansini, et al. (1988). "Regulation of endometrial transglutaminase activity during the menstrual cycle." *Biochem Int* **16**(1): 77-82.
- Simon-Vecsei, Z., R. Kiraly, et al. (2012). "A single conformational transglutaminase 2 epitope contributed by three domains is critical for celiac antibody binding and effects." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(2): 431-436.
- Smecuol, E., E. Maurino, et al. (1996). "Gynaecological and obstetric disorders in coeliac disease: frequent clinical onset during pregnancy or the puerperium." *Eur J Gastroenterol Hepatol* **8**(1): 63-89.
- Smyth, D. J., V. Plagnol, et al. (2008). "Shared and distinct genetic variants in type 1 diabetes and celiac disease." *N Engl J Med* **359**(26): 2767-2777.
- Sollid, L. M. (2002). "Celiac disease: dissecting a complex inflammatory disorder." *Nat Rev Immunol* **2**(9): 647-655.
- Sollid, L. M. and B. A. Lie (2005). "Celiac disease genetics: current concepts and practical applications." *Clin Gastroenterol Hepatol* **3**(9): 843-851.
- Sollid, L. M. and E. Thorsby (1993). "HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis." *Gastroenterology* **105**(3): 910-922.
- Soni, S. and S. Z. Badawy (2010). "Celiac disease and its effect on human reproduction: a review." *J Reprod Med* **55**(1-2): 3-8.
- Spurlin, T. A., K. Bhadriraju, et al. (2009). "The treatment of collagen fibrils by tissue transglutaminase to promote vascular smooth muscle cell contractile signaling." *Biomaterials* **30**(29): 5486-5496.
- Stamnaes, J., D. M. Pinkas, et al. (2010). "Redox regulation of transglutaminase 2 activity." *J Biol Chem* **285**(33): 25402-25409.
- Stazi, A. V. and A. Mantovani (2000). "A risk factor for female fertility and pregnancy: celiac disease." *Gynecol Endocrinol* **14**(6): 454-463.
- Straszewski-Chavez, S. L., V. M. Abrahams, et al. (2009). "The isolation and characterization of a novel telomerase immortalized first trimester trophoblast cell line, Swan 71." *Placenta* **30**(11): 939-948.
- Szondy, Z., I. Korponay-Szabo, et al. (2011). "Transglutaminase 2 dysfunctions in the development of autoimmune disorders: celiac disease and TG2-/- mouse." *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **78**: 295-345.
- Szondy, Z., Z. Sarang, et al. (2003). "Transglutaminase 2-/- mice reveal a phagocytosis-associated crosstalk between macrophages and apoptotic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(13): 7812-7817.
- Telci, D., R. J. Collighan, et al. (2009). "Increased TG2 expression can result in induction of transforming growth factor beta1, causing increased synthesis and deposition of matrix proteins, which can be regulated by nitric oxide." *J Biol Chem* **284**(43): 29547-29558.
- Telci, D. and M. Griffin (2006). "Tissue transglutaminase (TG2)--a wound response enzyme." *Front Biosci* **11**: 867-882.
- Telci, D., Z. Wang, et al. (2008). "Fibronectin-tissue transglutaminase matrix rescues RGD-impaired cell adhesion through syndecan-4 and beta1 integrin co-signaling." *J Biol Chem* **283**(30): 20937-20947.
- Terness, P., M. Kallikourdis, et al. (2007). "Tolerance signaling molecules and pregnancy: IDO, galectins, and the renaissance of regulatory T cells." *Am J Reprod Immunol* **58**(3): 238-254.

- Tersigni, C., R. Castellani, et al. (2014). "Celiac disease and reproductive disorders: meta-analysis of epidemiologic associations and potential pathogenic mechanisms." Hum Reprod Update **20**(4): 582-593.
- Thomas, J. W., P. L. Kendall, et al. (2002). "The natural autoantibody repertoire of nonobese diabetic mice is highly active." J Immunol **169**(11): 6617-6624.
- Thomazy, V. and L. Fesus (1989). "Differential expression of tissue transglutaminase in human cells. An immunohistochemical study." Cell Tissue Res **255**(1): 215-224.
- Tommasini, A., T. Not, et al. (2004). "Mass screening for coeliac disease using antihuman transglutaminase antibody assay." Arch Dis Child **89**(6): 512-515.
- Tonutti, E. and N. Bizzaro (2014). "Diagnosis and classification of celiac disease and gluten sensitivity." Autoimmun Rev **13**(4-5): 472-476.
- Toth, B., E. Garabuczi, et al. (2009). "Transglutaminase 2 is needed for the formation of an efficient phagocyte portal in macrophages engulfing apoptotic cells." J Immunol **182**(4): 2084-2092.
- Toth, B., Z. Sarang, et al. (2009). "Over-expression of integrin beta3 can partially overcome the defect of integrin beta3 signaling in transglutaminase 2 null macrophages." Immunol Lett **126**(1-2): 22-28.
- Trundle, A. and A. Moffett (2004). "Human uterine leukocytes and pregnancy." Tissue Antigens **63**(1): 1-12.
- Turner, P. M. and L. Lorand (1989). "Complexation of fibronectin with tissue transglutaminase." Biochemistry **28**(2): 628-635.
- Tursi, A., G. Giorgetti, et al. (2008). "Effect of gluten-free diet on pregnancy outcome in celiac disease patients with recurrent miscarriages." Dig Dis Sci **53**(11): 2925-2928.
- Upchurch, H. F., E. Conway, et al. (1991). "Localization of cellular transglutaminase on the extracellular matrix after wounding: characteristics of the matrix bound enzyme." J Cell Physiol **149**(3): 375-382.
- Vader, W., Y. Kooy, et al. (2002). "The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides." Gastroenterology **122**(7): 1729-1737.
- Van Genderachter, J. A., K. Movahedi, et al. (2006). "Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion." Immunobiology **211**(6-8): 487-501.
- van Heel, D. A., L. Franke, et al. (2007). "A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21." Nat Genet **39**(7): 827-829.
- Verderio, E., C. Gaudry, et al. (1999). "Regulation of cell surface tissue transglutaminase: effects on matrix storage of latent transforming growth factor-beta binding protein-1." J Histochem Cytochem **47**(11): 1417-1432.
- Verderio, E. A., A. Scarpellini, et al. (2009). "Novel interactions of TG2 with heparan sulfate proteoglycans: reflection on physiological implications." Amino Acids **36**(4): 671-677.
- Verderio, E. A., D. Telci, et al. (2003). "A novel RGD-independent cell adhesion pathway mediated by fibronectin-bound tissue transglutaminase rescues cells from anoikis." J Biol Chem **278**(43): 42604-42614.
- Vila, J., J. D. Isaacs, et al. (2009). "Regulatory T cells and autoimmunity." Curr Opin Hematol **16**(4): 274-279.
- Vince, G. S., P. M. Starkey, et al. (1990). "Flow cytometric characterisation of cell populations in human pregnancy decidua and isolation of decidual macrophages." J Immunol Methods **132**(2): 181-189.
- Voll, R. E., M. Herrmann, et al. (1997). "Immunosuppressive effects of apoptotic cells." Nature **390**(6658): 350-351.

- Wang, Z., R. J. Collighan, et al. (2010). "RGD-independent cell adhesion via a tissue transglutaminase-fibronectin matrix promotes fibronectin fibril deposition and requires syndecan-4/2 $\alpha 5\beta 1$ integrin co-signaling." J Biol Chem **285**(51): 40212-40229.
- Wang, Z. and M. Griffin (2012). "TG2, a novel extracellular protein with multiple functions." Amino Acids **42**(2-3): 939-949.
- Wang, Z., D. Telci, et al. (2011). "Importance of syndecan-4 and syndecan -2 in osteoblast cell adhesion and survival mediated by a tissue transglutaminase-fibronectin complex." Exp Cell Res **317**(3): 367-381.
- Warning, J. C., S. A. McCracken, et al. (2011). "A balancing act: mechanisms by which the fetus avoids rejection by the maternal immune system." Reproduction **141**(6): 715-724.
- Weiss, G., L. T. Goldsmith, et al. (2009). "Inflammation in reproductive disorders." Reprod Sci **16**(2): 216-229.
- Wicker, L. S., J. Clark, et al. (2005). "Type 1 diabetes genes and pathways shared by humans and NOD mice." J Autoimmun **25 Suppl**: 29-33.
- Wier, F. A. and C. L. Farley (2006). "Clinical controversies in screening women for thyroid disorders during pregnancy." J Midwifery Womens Health **51**(3): 152-158.
- Worthington, J. J., J. E. Klementowicz, et al. (2011). "TGFbeta: a sleeping giant awoken by integrins." Trends Biochem Sci **36**(1): 47-54.
- Xian, X., S. Gopal, et al. (2010). "Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix." Cell Tissue Res **339**(1): 31-46.
- Yamada, K. M. and S. Even-Ram (2002). "Integrin regulation of growth factor receptors." Nat Cell Biol **4**(4): E75-76.
- Yang, J., E. A. Cummings, et al. (2006). "Fetal and neonatal outcomes of diabetic pregnancies." Obstet Gynecol **108**(3 Pt 1): 644-650.
- Yu, L., D. T. Robles, et al. (2000). "Early expression of antiinsulin autoantibodies of humans and the NOD mouse: evidence for early determination of subsequent diabetes." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(4): 1701-1706.
- Zemskov, E. A., A. Janiak, et al. (2006). "The role of tissue transglutaminase in cell-matrix interactions." Front Biosci **11**: 1057-1076.
- Zemskov, E. A., E. Loukinova, et al. (2009). "Regulation of platelet-derived growth factor receptor function by integrin-associated cell surface transglutaminase." J Biol Chem **284**(24): 16693-16703.
- Zemskov, E. A., I. Mikhailenko, et al. (2011). "Unconventional secretion of tissue transglutaminase involves phospholipid-dependent delivery into recycling endosomes." PLoS One **6**(4): e19414.
- Zemskov, E. A., I. Mikhailenko, et al. (2012). "Tissue transglutaminase promotes PDGF/PDGFR-mediated signaling and responses in vascular smooth muscle cells." J Cell Physiol **227**(5): 2089-2096.
- Zemskov, E. A., I. Mikhailenko, et al. (2007). "Cell-surface transglutaminase undergoes internalization and lysosomal degradation: an essential role for LRP1." J Cell Sci **120**(Pt 18): 3188-3199.
- Zhang, Y. M., V. Rao Ch, et al. (2003). "Macrophages in human reproductive tissues contain luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors." Am J Reprod Immunol **49**(2): 93-100.

Lista de abreviaturas

AcMo	Anticuerpo Monoclonal
CTB	Citotrofoblasto
EC	Enfermedad Celíaca
EGF	Epidermal Growth Factor
EVT	Trofoblasto Extra-Vellositario
FN	Fibronectina
HLA	Human Leucocyte Antigen
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IL-6	Interleuquina 6
IL-10	Interleuquina 10
IL-12	Interleuquina 12
IUGR	Restricción del Crecimiento Intrauterino
LIE	Linfocitos Intraepiteliales
MEC	Matriz Extracelular
MFG-E8	Milk Fat Globule-EGF factor 8
MMP	Metaloproteinasa de Matriz Extracelular
NOD	Ratones Diabéticos No Obesos
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor
RAR	Receptor de Ácido Retinoico
RXR	Receptor X de Ácido Retinoico
STB	Sinciotrofoblasto
TG	Transglutaminasa
tTG	Transglutaminasa tisular (ó TG2)
TGF-β1	Transforming Growth Factor- β 1
TNF-α	Tumor Necrosis Factor- α
TPO	Peroxidasa Tiroidea
uNK	Natural Killer Uterinas (ó deciduales)
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor