

Estudio teórico de la Zonulina como nueva diana terapéutica para el tratamiento de la Enfermedad Celíaca.

Sara Blanco^a, Sagrario Corrales^b, Isabel Gómez^c, Laura Lebrón^d, Laura Madrid^e

Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España.

a. sarukaras@gmail.com b. sagrariocorrales@gmail.com c. isabelgomezcalcerrada@gmail.com
d. lauralebronmora@gmail.com e. lauramadrid98@gmail.com

VI Congreso de Señalización Celular, SECUAH 2021.

29 de marzo a 30 de abril, 2021. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares, Madrid. España.

Palabras clave: Enfermedad celíaca; Gliadina; Zonulina; Uniones estrechas; PAR2

Resumen

La enfermedad celíaca tiene una prevalencia de entre el 1-2% de la población mundial, siendo ésta una enfermedad autoinmune caracterizada por una reacción inmunológica exacerbada causada por algunas de las proteínas que conforman el gluten, como la gliadina. En el transcurso de la enfermedad, los péptidos de gliadina son transportados desde el lumen intestinal hacia la lámina propia a través de los enterocitos que conforman el epitelio intestinal. Existen dos vías principales para el transporte de sustancias a través del epitelio intestinal, la vía transcelular y la paracelular, cobrando esta última una gran importancia en el transporte de gliadina al ser un péptido de gran tamaño. El transporte paracelular se debe al desensamblaje y pérdida de las uniones estrechas que mantienen unidos los enterocitos entre sí, provocando la entrada a gran escala de la gliadina. En este proceso, la zonulina adquiere un papel clave, al ser la proteína encargada de iniciar la correspondiente señalización que dará lugar al aumento de la permeabilidad paracelular. El objetivo de este estudio es evitar la pérdida de las uniones estrechas para disminuir el transporte de gliadina y con ello, la correspondiente respuesta inflamatoria y daño al epitelio. Para ello proponemos un inhibidor específico para la zonulina en el lumen que impida su unión con el receptor PAR2, basándonos en un estudio teórico que comprende un proceso de cribado (ensayo *High Throughput Screening* o *HTS*), además de distintos ensayos *in vitro* e *in vivo* para optimizar las características farmacológicas del posible inhibidor.

Cita: Blanco, Sara; Corrales, Sagrario; Gómez, Isabel; Lebrón, Laura; Madrid, Laura (2021) Estudio teórico de la Zonulina como nueva diana terapéutica para el tratamiento de la Enfermedad Celíaca. Actas del VI Congreso de Señalización Celular, SECUAH 2021. 29 de marzo a 30 de abril, 2021. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares, Madrid. España. *dianas* 10 (1): e202103fa. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e202103fa](http://www3.uah.es/dianas?e202103fa) <http://www3.uah.es/dianas?e202103fa>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © Blanco S, Corrales S, Gómez I, Lebrón L, Madrid L. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

Enfermedad celiaca

La enfermedad celíaca es una enfermedad autoinmune y sistémica, de origen inmunológico y genético que se caracteriza por una intolerancia a las proteínas del gluten (gliadinas, secalinas, hordeinas y aveninas) [1]. Como consecuencia, existe un daño a nivel intestinal que incluye: inflamación, atrofia de las vellosidades e hiperplasia de las criptas. Este proceso inflamatorio desencadena una mala absorción de los demás nutrientes presentes en la dieta. Es una enfermedad combinatoria que necesita de ambos factores, ambiental y genético para que se desarrolle [1].

La prevalencia de la enfermedad celiaca es del 1-2% de la población mundial y es más frecuente en mujeres que en hombres (a razón 2:1). Sin embargo, se estima que el 75% de pacientes están aún sin diagnosticar [2].

Las manifestaciones clínicas son muy variadas y específicas en cada paciente, en el caso de pacientes pediátricos cursa con episodios diarreicos, mientras que en adultos puede darse de manera asintomática o padecer alteraciones del tracto intestinal, distensión abdominal e incluso trastornos mentales [3]. Algunos pacientes aún con tratamiento pueden manifestar un empeoramiento de la enfermedad, pudiendo aparecer la enfermedad celíaca refractaria, que transcurre con hemorragias digestivas, tetania, hipocalcemia, edemas e hipoalbuminemia, entre otros síntomas [2-3].

El diagnóstico para la celiaquía puede comprender tres pruebas diferentes. En primer lugar, un análisis de sangre para detectar anticuerpos específicos anti-gliadina, anti-transglutaminasa tisular o IgA. Si el resultado es positivo, se realizará una biopsia de intestino mediante endoscopia en la que se espera un

acortamiento de las vellosidades intestinales y una mayor población de linfocitos intraepiteliales [4]. Por último, existe un método diagnóstico innovador que consiste en la fenotipificación de alelos que codifican para HLA-DQ8/DQ2, debido al carácter genético de la enfermedad.

En cuanto al tratamiento, hoy en día los pacientes celíacos únicamente disponen de una dieta estricta sin gluten (gluten free diet, GFD), cuyo seguimiento puede desembocar en una mejoría sintomatológica y regeneración del daño en la mucosa intestinal. No obstante, el cumplimiento estricto de GFD puede resultar complicado por diversas razones como la presencia de trazas de gluten en muchos alimentos, la falta de opciones “gluten-free” en restaurantes o los precios elevados [5].

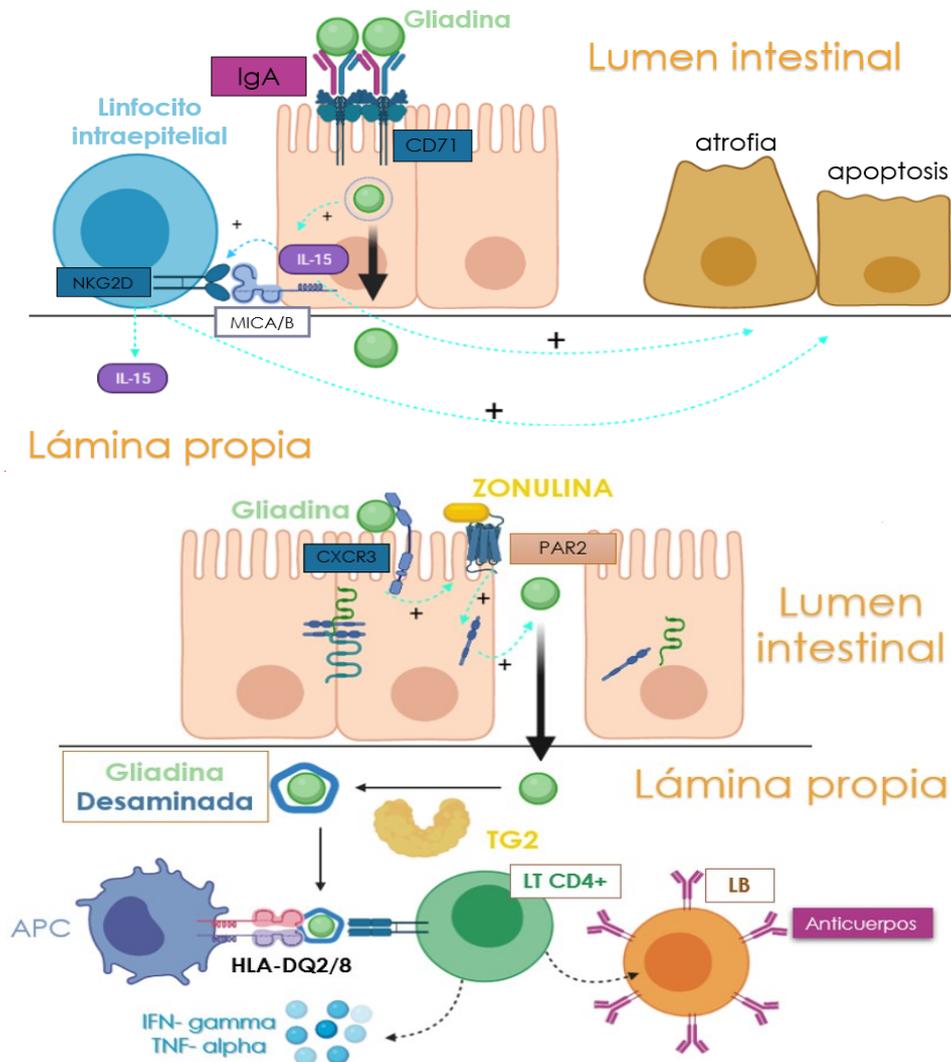


Figura 1.- Fisiopatología de la enfermedad celíaca. Principales vías de paso de la gliadina desde el lumen hacia la lámina propia. En la parte superior, está representada la vía transcelular donde podemos ver la unión de la gliadina y su internalización en el enterocito. También está representada la respuesta inmune innata mediada por la señalización de IL-15 y linfocitos intraepiteliales. En la parte inferior se representa la vía de transporte paracelular de gliadina, mediante la unión de ésta a su receptor específico (CXCR3), que favorece la relajación de las uniones estrechas a través de una señalización mediada por zonulina que provoca el aumento de la permeabilidad intestinal. Así mismo, tiene lugar la respuesta adaptativa favorecida por linfocitos T CD4 +, citoquinas y linfocitos B. Todo ello llevará a la atrofia y apoptosis de los enterocitos. Figura realizada con Biorender.

Fisiopatología de la enfermedad celíaca

Como se ha comentado anteriormente, la enfermedad celíaca se caracteriza por la intolerancia a determinadas proteínas del gluten. El gluten es una construcción de proteínas dividida en fracciones poliméricas como la glutéina, y monoméricas como la gliadina. En este último caso, la gliadina es estable frente a la degradación de proteasas intraluminales y enzimas de membrana por su alto contenido en prolina y glutamina [6]. Como consecuencia, grandes fragmentos peptídicos de gliadina sin degradar permanecen en la luz intestinal, activando así la respuesta inmune innata y adaptativa en individuos genéticamente predispuestos.

La gliadina utiliza dos vías de transporte para adentrarse en la lámina propia, la transcelular y la paracelular (Figura 1). Así, por la vía transcelular, los anticuerpos IgA se unen a la gliadina y co-localizan

con el receptor de la transferrina (CD71) que hace posible la internalización de los péptidos de gliadina, llegando estos finalmente a la lámina propia. Por otro lado, en la vía paracelular, la gliadina se une a su receptor específico CXCR3 en la parte apical del enterocito, el cual recluta a una proteína adaptadora, MyD88, que promueve o bien la inactivación o bien la actuación del complejo C1r-like. La inactivación del complejo C1r-like dará lugar a un péptido inmaduro al que se denomina pre-HP2 o zonulina [7]. Esta última proteína se encarga de disminuir las uniones estrechas entre los enterocitos del lumen intestinal, aumentando así la permeabilidad de la gliadina hacia la lámina propia [6-7].

Una vez los fragmentos de gliadina entran hacia la lámina propia tienen lugar dos tipos de respuesta inmune que cooperan para lograr un efecto final de destrucción de la mucosa intestinal y como consecuencia se produce la muerte de los enterocitos.

En la lámina propia, la gliadina es desaminada por la transglutaminasa 2 (TG2), aportando al péptido de gliadina cargas negativas que le confieren una mayor inmunogenicidad, al ser detectados por las células presentadoras de antígenos a través de las proteínas de superficie HLA-DQ8/DQ2 [8]. Cuando el antígeno de gliadina es presentado a los linfocitos T CD4+, estos son activados y comenzarán a secretar citocinas proinflamatorias (TNF α , TNF γ) que inducen, a su vez, la activación de los linfocitos B, encargados de secretar anticuerpos IgA anti-gliadina [9]. De este modo, se inicia la respuesta inmune adaptativa característica de la enfermedad celíaca.

Por otro lado, la respuesta inmune innata se caracteriza por la secreción de IL-15 por parte de macrófagos, células dendríticas, así como los propios enterocitos. La IL-15 media la citotoxicidad de los linfocitos intraepiteliales, regulando la expresión del receptor NKG2D [10]. Este receptor, interacciona con MIC-A y MIC-B (MHC clase I A y B respectivamente) presentes en la membrana de los enterocitos y mediando la respuesta dañina contra el epitelio [8-9].

Estrategias terapéuticas y farmacológicas para el tratamiento de la enfermedad celíaca

Actualmente, la única terapia disponible para paliar los efectos de la enfermedad celíaca es la adherencia a una dieta libre de gluten. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, un cumplimiento estricto de la dieta gluten-free no siempre es posible. Por ello, desde hace años el gran objetivo de la investigación es la obtención de terapias farmacológicas efectivas para el paciente celíaco [7].

Las nuevas terapias en las que se está investigando se pueden clasificar según su diana. Por un lado, terapias que tienen como diana el gluten, entre las que se podría destacar el empleo de un polímero de elevada afinidad que secuestra al gluten en el lumen evitando su absorción [5]. En segundo lugar, las terapias que tienen como objetivo la regulación de la respuesta inmune. Dentro de este grupo se encuentra una de las estrategias más prometedoras, la obtención de una vacuna para inducir tolerancia al gluten [5]. Por último, se han clasificado las terapias que tienen como estrategia la disminución de la permeabilidad transcelular del epitelio intestinal para evitar el transporte a gran escala de las moléculas de gliadina [11].

Un ejemplo de terapia farmacológica para la disminución de la permeabilidad transcelular es el AT-1001. El AT-1001 es un péptido sintético cuya función es unirse a los receptores de la Zonulina de manera competitiva actuando como antagonista. Actualmente, es una terapia prometedora que se encuentra en ensayos clínicos de fase 3 [11].

Elección de la diana farmacológica

Siguiendo el ejemplo del fármaco AT-1001, decidimos centrarnos en el diseño de un nuevo fármaco implicado en la disminución de la permeabilidad paracelular de los enterocitos, para reducir al máximo el transporte de gliadina e impedir que se desencadene la correspondiente respuesta inmunológica e inflamatoria.

Seleccionamos una nueva diana terapéutica, basándonos en la etiología de la enfermedad y en el mecanismo por el cual se produce la desorganización de las uniones estrechas que conducen al correspondiente aumento de la permeabilidad paracelular y el transporte a gran escala de la gliadina. Tras un periodo de investigación bibliográfica se decidió que la propia zonulina podría ser una de las mejores dianas terapéuticas para atajar el problema.

La zonulina, una vez secretada al lumen, se une al receptor PAR2, encargado de transactivar al receptor EGFR, que desencadena la cascada de señalización que concluye con la desorganización de las uniones estrechas [12]. Teniendo esto en cuenta, se determinó que la mejor estrategia para inhibir su acción sería el diseño de un inhibidor de la zonulina en el lumen.

Zonulina

La zonulina es la forma inmadura de la proteína haptoglobina (HP2), o lo que es lo mismo, la HP2 se transcribe y traduce como una pre-proteína inmadura pre-HP2 o zonulina [13-14]. La pre-HP2 permanece

en el Retículo Endoplasmático, donde el complejo proteico C1r-like lleva a cabo la ruptura proteolítica que dará lugar a la forma madura de la proteína [14].

Hasta hace no mucho, se pensaba que la forma inmadura de la haptoglobina carecía de función específica, ya que se vio que en personas sanas los niveles de zonulina circulante en el plasma son muy bajos. Sin embargo, el nivel de zonulina circulante aumenta enormemente en pacientes celíacos [12]. Esto fue lo que llevó a plantear la hipótesis de que la zonulina no era simplemente la forma inmadura de la HP2, sino que tenía una función específica y que, además, estaba implicada de algún modo en el desarrollo de la enfermedad [12].

Estructuralmente, la haptoglobina HP2 está formada por una cadena beta constante unida covalentemente por puentes disulfuro a una o dos subunidades alfa. Existen dos isoformas de la subunidad alfa (alfa 1 y alfa 2) que dan lugar a tres subtipos de haptoglobina: HP1-1 y HP2-2 (homocigóticos) y HP2-1 (heterocigótico) [11,13]. Cuando el gen que codifica para la HP2 se transcribe, se forma un ARNm que da lugar a una única cadena polipeptídica que contiene ambas subunidades (beta y alfa 2), la zonulina [11].

La subunidad beta contiene la secuencia activadora del receptor PAR2. Esta secuencia que consta de seis aminoácidos (FCAGMS) será la encargada de unirse y activar al receptor PAR2 cuando la zonulina es secretada por los enterocitos [12]. La zonulina, una vez que se une a los receptores PAR2 a través de dicha secuencia, promueve la transactivación de EGFR.

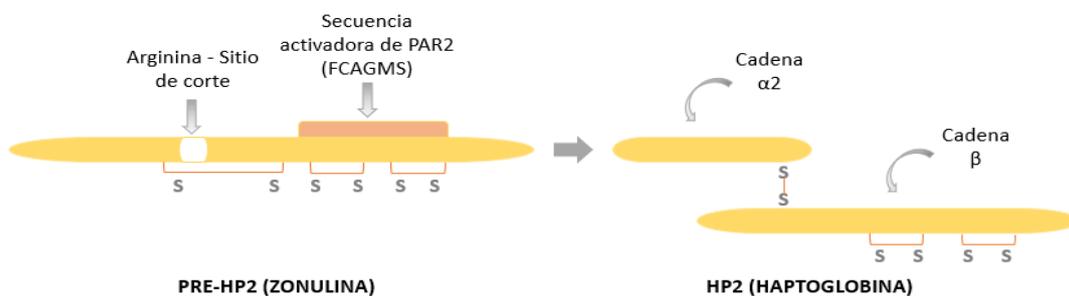


Figura 2.- Esquema de las formas inmadura y madura de la proteína haptoglobina 2. En la parte izquierda, está representada la pre-HP2 o zonulina, donde se señala la secuencia activadora del receptor PAR2, así como el sitio de corte sobre el que actúa el complejo C1r-like en el Retículo Endoplasmático para dar lugar a la forma madura de la proteína. A la derecha, un esquema de la haptoglobina, donde pueden diferenciarse las dos cadenas polipeptídicas ($\alpha 2$ y β) unidas covalentemente por un puente disulfuro tras el procesamiento por el complejo C1r-like. Figura realizada con Biorender.

La transactivación de EGFR es tanto dependiente como independiente de ligando, a través de las proteasas ADAM y la quinasa Src respectivamente. La activación del EGFR inicia una cascada de señalización dependiente de PKC- α , que provoca la desorganización y el desensamblaje de las uniones estrechas [12]. Una de las consecuencias de este desensamblaje es que la proteína ZO-1, que media la unión de los filamentos de actina a las ocludinas y claudinas en las uniones estrechas, deja de unir ambos componentes y pasa a dispersarse por toda la célula [12,15].

Todo el conjunto de sucesos, incluyendo desde la secreción de la zonulina por los enterocitos hasta la pérdida de las uniones estrechas, es lo que provoca la entrada masiva de gliadina (componente del gluten) y la correspondiente respuesta inmunológica e inflamatoria que daña al epitelio intestinal. Para evitarlo, el objetivo de nuestro estudio teórico es obtener un inhibidor de la zonulina en el lumen intestinal que impida su unión a PAR2.

El inhibidor de zonulina debe cumplir dos requisitos: en primer lugar, unirse y enmascarar la secuencia activadora de PAR2 en la zonulina; y, en segundo lugar, dicha unión debe ser permanente y con una afinidad mayor que la unión zonulina-PAR2.

Diseño HTS (High Throughput screening)

Screening virtual: selección de hits

El cribado virtual o *virtual screening* consiste en el cribado experimental de grandes bibliotecas de productos químicos frente a un objetivo relevante terapéuticamente, dirigido a identificar y seleccionar un número limitado de candidatos con actividad biológica. El *screening virtual* es una herramienta esencial para optimizar de forma rápida y rentable el descubrimiento de candidatos potenciales, por ello se tiene como objetivo comprender la base molecular de la enfermedad celíaca, utilizando la estructura tridimensional de una diana biológica implicada en el proceso, la zonulina [16].

La zonulina se encuentra sobreexpresada en trastornos autoinmunes donde existe una desregulación de las uniones estrechas en enterocitos, como la enfermedad celíaca [17]. Para llevar a cabo el ensayo se ha

empleado la estructura tridimensional de la forma madura de la zonulina, la haptoglobina 2, debido a la ausencia de la estructura de la zonulina (Figura 3). No obstante, se piensa que esta diferencia no influirá en ensayos posteriores.

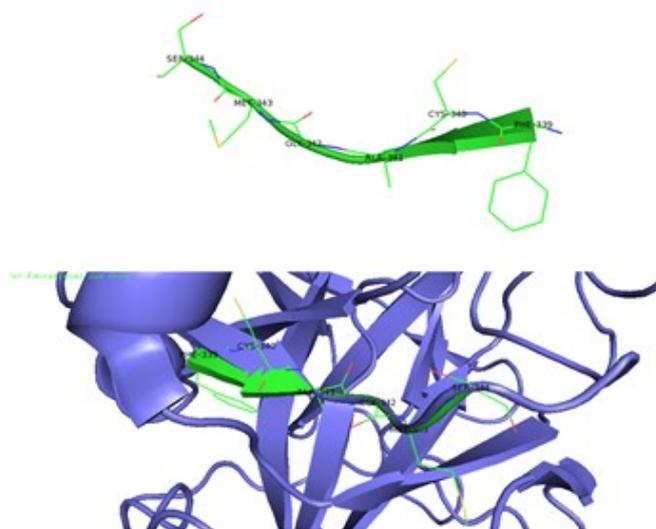


Figura 3.- Estructura tridimensional de la haptoglobina 2 (Hp 2-2) realizada mediante el programa de visualización molecular PyMOL. La zonulina es una proteína de 47 kDa, precursora de la haptoglobina 2 (Hp 2-2), se muestra la secuencia de unión al receptor PAR2 (GPCR clase A) resaltada en verde mostrando las cadenas laterales y los aminoácidos que la conforman (FCAGMS) [12].

Se expone el flujo de trabajo para identificar inhibidores específicos de la zonulina al unirse a la secuencia de unión con el receptor PAR2 (GPCR clase A) [12]. Cada compuesto de la biblioteca se acopla virtualmente al sitio de unión de la diana (*docking molecular*) y recibe una puntuación. Finalmente, se obtiene como resultado una pequeña cantidad de compuestos que interaccionan con la zonulina y presentan propiedades de interés (tanto toxicidad como propiedades ADME, análisis de interacción, propiedades farmacológicas). Después, se realiza un cribado de alto rendimiento o high throughput screening (HTS) para mejorar y optimizar las propiedades de acoplamiento de los candidatos, de forma complementaria al *screening virtual*. Esto permite reducir el número de compuestos que se testarán a continuación en ensayos *in vitro* e identificar los hits o moléculas biológicamente activas que tienen capacidad de secuestrar la zonulina [16].

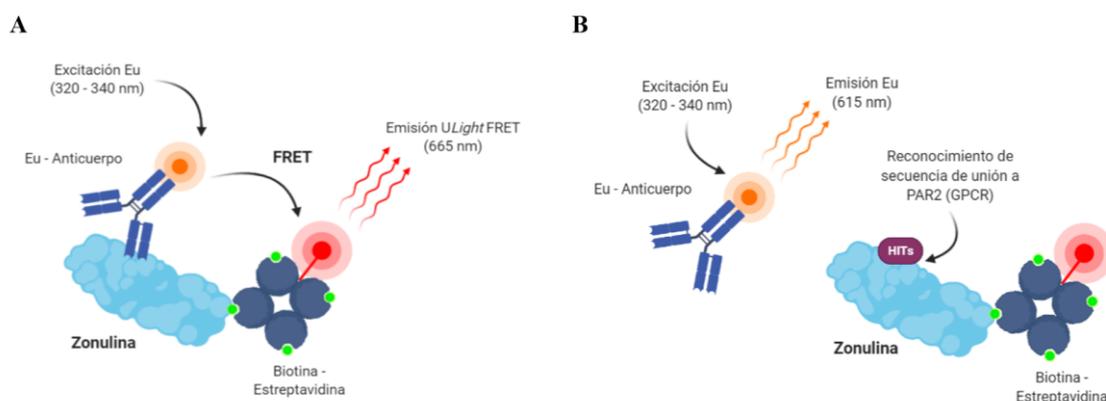


Figura 4.- Ensayo HTS basado en fluorescencia para evaluar inhibidores de zonulina. LANCE Ultra implica la unión de zonulina biotinilada a bolas aceptoras recubiertas de estreptavidina. La secuencia específica FCAGMS de la zonulina es reconocida por los anticuerpos marcados con europio (Eu) lo que favorece una proximidad entre donador y receptor (~ 10 nm), teniendo lugar el fenómeno FRET entre donador y receptor, y la emisión de fluorescencia a 665 nm del receptor *ULight*. Un posible inhibidor (hit) unido a zonulina provoca emisión de fluorescencia a 615 nm. Figura realizada con BioRender.

Confirmación de *hits*: *hit a lead*

Para continuar con el estudio hemos llevado a cabo un ensayo de validación basado en fluorescencia de los hits seleccionados mediante HTS. El ensayo LANCE – Ultra (FRET) implica la unión de zonulina biotinilada a bolas recubiertas de estreptavidina marcadas con un fluoróforo aceptador, y por otro lado la zonulina es reconocida por anticuerpos marcados con europio (Eu), lo que favorece la proximidad entre donador y receptor (~ 10 nm), teniendo lugar el fenómeno FRET y la emisión de fluorescencia a 665 nm

del receptor *ULight*. Por el contrario, si la zonulina interacciona con un posible candidato a inhibidor o *hit*, tiene lugar la emisión fluorescente del donador (Figura 4) [18]. Por tanto, los inhibidores de zonulina se identifican como compuestos que reducen la fluorescencia *ULight* emitida a 665 nm.

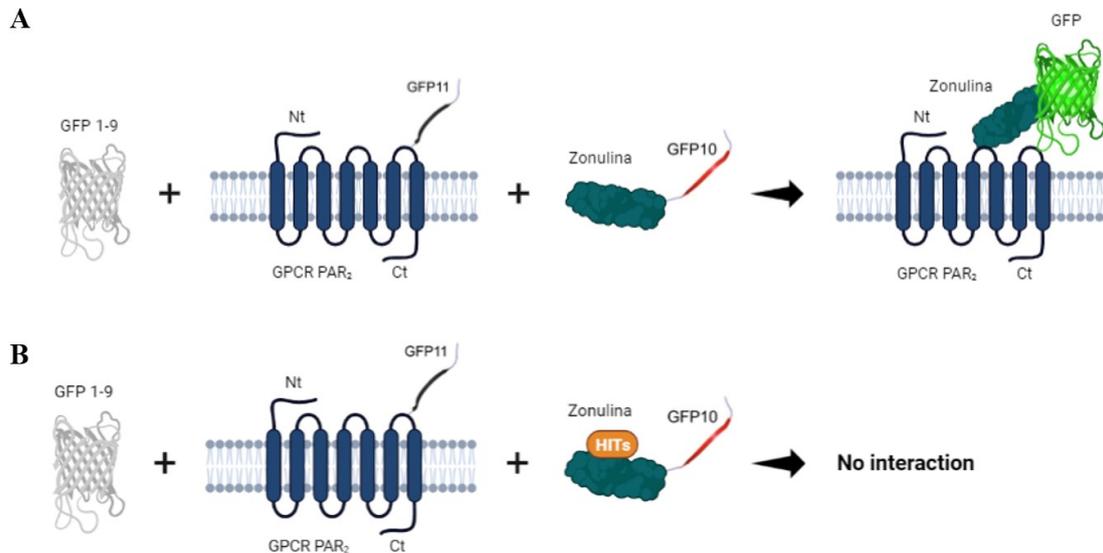


Figura 5.- Ensayo de asociación tripartita Split - GFP. Sistema de etiquetado mediante la proteína GFP dividida en tres fragmentos que permite informar de las interacciones proteína - proteína mediante la fusión del fragmento GFP10 asociado a zonulina y el fragmento GFP11 asociado al receptor PAR2, con la proteína GFP 1-9. **A.** La interacción entre GFP10 y GFP11 viene dada por la estrecha proximidad entre ambas proteínas, lo que provoca la asociación espontánea con el fragmento GFP1-9 para la reconstrucción completa de GFP. **B.** Si zonulina y receptor PAR2 no interaccionan por la presencia de un inhibidor (hit), GFP10 y GFP11 no se unen y la energía de unión es muy elevada para permitir la complementación con GFP 1-9. Figura realizada con BioRender.

Posteriormente, se lleva a cabo un segundo ensayo de validación basado en fluorescencia mediante asociación tripartita Split-GFP, acoplado al ensayo HTS. El objetivo es detectar la interacción proteína - proteína entre la zonulina y el receptor PAR2 en presencia de los *hits* seleccionados anteriormente, lo que nos permite estudiar la afinidad y estabilidad de unión del inhibidor de zonulina, en presencia de su receptor endógeno.

En este ensayo se diseña un sistema de etiquetado mediante la proteína GFP dividida en tres fragmentos que permite informar de las interacciones proteína - proteína mediante la fusión del fragmento GFP10 asociado a zonulina y el fragmento GFP11 asociado al receptor PAR2, con la proteína GFP 1-9. Si la proteína GFP no se completa y no se unen todos los fragmentos no hay fluorescencia (Figura 5) [19].

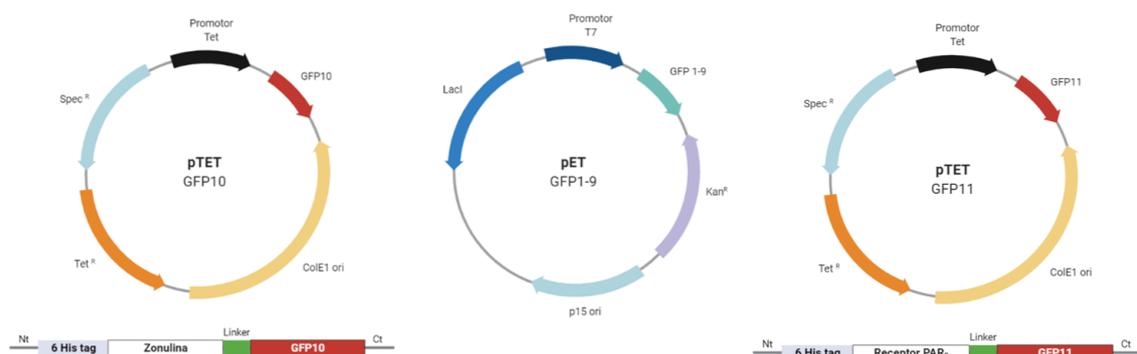


Figura 6.- Sistema de vectores para ensayos tripartitos con Split - GFP. El vector pTET ColE1 GFP10 incluye un origen de replicación bajo el control de promotor Tet, un sitio de marcaje interrumpido por la proteína zonulina separando el N-terminal de GFP10 mediante la región linker. El vector pTET GFP10 se emplea en combinación con el vector pET p15ori GFP1-9. La co-inducción del promotor Tet por Tetraciclina y del promotor T7 por IPTG, dan lugar a la expresión de los fragmentos Zonulina - GFP10 y GFP1.9, necesarios para el ensayo Split - GFP. El tercer fragmento es expresado en un vector pcDNA3.1 para células de mamífero CaCo2 (enterocitos), mostrando una construcción simplificada para un modelo en *E.coli* con el vector pTET ColE1 GFP11. Figura realizada con BioRender.

Los vectores pTET ColE1 GFP10 y pET p15ori GFP1-9 se transfectan en células de *E.coli* de la cepa BL21 (DE3) en presencia de Tetraciclina e IPTG, respectivamente en cultivos independientes. Esto

permite obtener la proteína de fusión Zonulina - GFP10 y la proteína en barril GFP 1-9, y optimizar las proporciones necesarias de ambos para llevar a cabo el ensayo. El producto de estos clonajes se emplea para estimular células Caco-2 (línea eucariota de enterocitos) que expresan el receptor PAR2 fusionado con el fragmento GFP11 mediante el vector pcDNA3.1 (Figura 6) [20].

De esta manera, la zonulina se expresa fusionada con el fragmento GFP10, mientras que el receptor PAR2 se expresa fusionado al fragmento GFP11 en el tercer *loop* extracelular para evitar añadirlo en el extremo N - terminal o C - terminal de la proteína, ya que podría influir en la unión a su ligando. La interacción entre GFP10 y GFP11 viene dada por la estrecha proximidad e interacción de zonulina y receptor PAR2, lo que provoca la asociación espontánea con el fragmento GFP1-9 para la reconstrucción completa de GFP. Esto permite obtener una señal fluorescente que posteriormente se lleva a cabo su cuantificación [21]. No obstante, se espera que la interacción de la zonulina con los candidatos o *hits* provoque una disminución de la señal de fluorescencia detectada ya que la zonulina no interacciona con el receptor PAR2. Por tanto, los fragmentos GFP10 y GFP11 no interaccionan ni pueden completar la proteína fluorescente GFP 1-9.

Ensayos *in vitro* y resultados esperados

Una vez que tenemos nuestros cabezas de serie, diseñamos una serie de ensayos *in vitro* para testar la actividad de nuestros leads utilizando la línea celular Caco-2, células epiteliales derivadas de carcinoma colorrectal humano [22]. En condiciones de cultivo específicas, las células adquieren una serie de características fenotípicas y morfológicas propias de los enterocitos que recubren el intestino delgado, siendo un buen modelo para el estudio de las alteraciones que se producen en la barrera epitelial intestinal de personas celiacas [23].

En primer lugar, se desarrollarán dos ensayos para analizar la expresión y localización de diferentes proteínas implicadas en la vía de señalización que desencadena la unión de la zonulina a sus receptores. Realizaremos un Western Blot para comprobar que nuestro lead se ha unido a la zonulina y por lo tanto no se ha producido la transactivación, esperando obtener una disminución de la expresión de p-EGFR, Src y de distintas metaloproteasas como las ADAM.

A continuación, utilizaremos la técnica de inmunocitoquímica fluorescente para observar la localización de dos proteínas, ZO-1 y ocludina. Para ello contaremos con anticuerpos primarios anti ZO-1 y anti Ocludina, y anticuerpos secundarios conjugados a dos fluorocromos (DAPI y ALEXA FLUOR 568). De tal forma que en ausencia de nuestros leads, esperamos observar Zo-1 en azul y ocludina en rojo dispersos por el citoplasma, sin embargo, con los leads, observaríamos un color naranja en la membrana, lo que significa que están formando parte de las uniones estrechas entre los enterocitos [24].

Una vez que sabemos que nuestros leads impiden la transactivación y con ello evitan que las uniones estrechas entre los enterocitos se rompan, queremos observar que la permeabilidad celular disminuye mediante un ensayo TEER. La técnica TEER mide la resistencia eléctrica a través de una monocapa de células utilizando un voltímetro. El valor obtenido refleja la facilidad de paso de corriente eléctrica entre células, de tal forma que, mediante una serie de fórmulas, cuanto menor sea el valor obtenido, más separadas están las células [25]. Nuestros resultados mostrarían un aumento en los valores TEER en las células Caco-2 que tienen nuestros leads, confirmando así que las células endoteliales están más juntas debido a que no se ha producido la ruptura de las uniones estrechas [24].

Ensayos *in vivo* y resultados esperados

Se desarrollará un ensayo *in vivo* para seleccionar finalmente la molécula inhibidora de la zonulina que compondrá nuestro fármaco. Para ello, utilizaremos como modelo animal, ratones transgénicos HLA-DQ8 que previamente han sido sensibilizados frente a la gliadina [26]. Se establecieron tres grupos de estudio: (1) ratones control sanos y con la enfermedad, ambos serán testados sin ningún tipo de tratamiento y tras la administración del vehículo del fármaco (para ver posible toxicidad), (2) ratones con la enfermedad tratados con nuestro fármaco vehiculizado a una dosis baja y (3) ratones con la enfermedad tratados con el fármaco vehiculizado a dosis alta. Cabe destacar que replicaremos el experimento para ratones a los que se les administra una dieta con una baja cantidad en gluten, media y alta.

Vehiculización del fármaco

Determinaremos la vehiculización del fármaco. Disponemos de una gran ventaja, puesto que fármacos como AT-1001 ya han sido probados en fases clínicas donde se observó la eficacia de estos tras ser administrados, de forma segura y efectiva, de forma oral tras la ingesta de gluten. La forma farmacéutica oral de elección fueron cápsulas en cuyo interior había pellets con una cubierta gastrorresistente, con el objetivo de evitar la degradación del péptido activo por las proteasas y los ácidos gástricos [27].

Nuestro fármaco al dirigirse también al lumen intestinal para actuar sobre la diana, podría ser vehiculizado del mismo modo de forma eficaz y segura. Puesto que este tipo de vehiculización se ha visto que tiene efectos locales y no sistémicos.

Análisis previos al sacrificio de los ratones

Para poder determinar el estado de la permeabilidad intestinal dispondremos de una prueba no invasiva (LAMA), que consiste en la ingestión de una solución que contiene dos azúcares-alcoholes, que se caracterizan por no ser degradados ni metabolizados por el organismo y que son de tamaños diferentes entre sí: (1) lactulosa: molécula de gran tamaño (9,5 Å) que representa a los macronutrientes que, en circunstancias normales, no atraviesan la barrera intestinal; (2) manitol: molécula de pequeño tamaño (6,7 Å) que representa a los micronutrientes que, en circunstancias normales, son absorbidos por las microvellosidades de los enterocitos [28].

Se obtendrán muestras de orina durante las 5 horas posteriores a la toma de estos azúcares. Una vez cuantificadas las moléculas en la muestra de orina se considera que: si la lactulosa se obtiene en una cantidad mayor de la esperada, la mucosa intestinal ha permitido el paso de esta molécula en exceso como consecuencia de un aumento de la permeabilidad de esta. Esto es lo que esperamos observar en ratones enfermos no tratados. Si el manitol se obtiene en una cantidad inferior a la esperada, se considera que se ha absorbido poco a través de la mucosa intestinal como consecuencia de una disminución de la permeabilidad intestinal, lo que puede estar relacionado con problemas de malnutrición. Es por ello, que en nuestro caso no lo observaríamos. Sin embargo, en caso de obtenerse niveles de ambas moléculas dentro del estándar establecido, se entiende que la mucosa intestinal tiene una permeabilidad normal. Es lo que esperamos observar tras la administración del fármaco [29].

Por otro lado, vamos a medir la respuesta adaptativa mediante citometría de flujo. Haremos extracciones de sangre a los ratones en semanas sucesivas. Posteriormente, para la separación de las células mononucleares de sangre periférica usamos el Ficoll y, observamos los resultados en el citómetro de flujo. Tras el tratamiento, se espera observar una disminución de los linfocitos T CD4+ y CD8+.

Análisis posteriores al sacrificio de los ratones

Tal y como se realizó en estudios *in vitro*, realizaremos una inmunohistoquímica fluorescente, donde esperamos observar los mismos resultados.

En este caso, para medir la respuesta adaptativa extraeríamos el nódulo linfático de los ratones y añadiríamos 100 µL de gliadina al medio para estimular la respuesta inmune. En los ratones celíacos, en el nódulo linfático habrá células dendríticas que reconozcan a la gliadina y la presentarán por el HLA-DQ2/DQ8 y, por tanto, observamos T CD8+. Además, habrá CD44+, es decir, interferón gamma +. Sin embargo, en los ratones tratados con el fármaco esperamos observar una disminución en la expresión del interferón.

Posibles efectos adversos

Como se ha comentado anteriormente, AT-1001 es un péptido que antagoniza la acción de la zonulina a través del bloqueo del receptor CXCR3 [30]. Por sus semejanzas con nuestro fármaco, cabría esperar que los posibles efectos adversos fueran similares a los que AT-1001 ha mostrado en fases preclínicas. Destacando únicamente el dolor de cabeza y cansancio [27].

Perspectivas futuras

Con este estudio pretendemos diseñar una terapia alternativa a la actual dieta libre de gluten, que permita una mejora de la calidad de vida de las personas que padecen celiaquía. Además, proponemos una posible terapia combinada con el secuestrador de la gliadina [5], para así también inhibir su transporte por la vía transcelular y mejorar la eficacia de nuestro tratamiento.

En cuanto a las perspectivas de futuro de esta terapia, se desearía conseguir un método no invasivo, con efecto sinérgico, elevada biodisponibilidad y una administración fácil y portátil que permita la autonomía del paciente.

Bibliografía

1. Polanco Allué, I. (2014). Enfermedad celíaca. *Revista Del Laboratorio Clínico*, 7(4), 141-144. <https://doi.org/10.1016/j.labcli.2014.10.003>
2. Malamut, G., Cording, S., y Cerf-Bensussan, N. (2019). Recent advances in celiac disease and refractory celiac disease. *F1000research*, 8, 969. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18701.1>
3. Diagnóstico de la enfermedad celíaca. (2006). *Gastroenterología Y Hepatología Continuada*, 5(6), 267-271. [https://doi.org/10.1016/s1578-1550\(06\)74324-8](https://doi.org/10.1016/s1578-1550(06)74324-8)
4. Walker, M., y Murray, J. (2011). An update in the diagnosis of coeliac disease. *Histopathology*, 59, 166-179 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2010.03680.x>

5. Vaquero, L., Rodríguez-Martín, L., León, F., Jorquera, F., y Vivas, S. (2018). New celiac disease treatments and their complications. Nuevas terapias en la enfermedad celiaca y sus complicaciones. *Gastroenterología Y Hepatología*, 41(3), 191-204. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2017.12.002>
6. Lebowitz, B., Sanders, D., y Green, P. (2018). Coeliac disease. *The Lancet*, 391(10115), 70-81. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)31796-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)31796-8)
7. Medhi, B., Singh, R., Singh, A., Batra, G., y Kaur, H. (2019). Novel targets for drug discovery in celiac disease. *Indian Journal Of Pharmacology*, 51(5), 359. https://doi.org/10.4103/ijp.ijp_679_19
8. Goodsell, D. (2017). Tissue Transglutaminase and Celiac Disease. *RCSB Protein Data Bank*. https://doi.org/10.2210/rcsb_pdb/mom_2017_5
9. Matori, S., Fuhrmann, G., y Leroux, J. (2012). Celiac Disease: A Challenging Disease for Pharmaceutical Scientists. *Pharmaceutical Research*, 30(3), 619-626. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0951-x>
10. Martín-Pagola, A., Pérez-Nanclares, G., Ortiz, L., Vitoria, J., Hualde, I., y Zaballa, R. et al. (2004). MICA response to gliadin in intestinal mucosa from celiac patients. *Immunogenetics*, 56(8), 549-554. <https://doi.org/10.1007/s00251-004-0724-8>
11. Valitutti, F., y Fasano, A. (2019). Breaking Down Barriers: How Understanding Celiac Disease Pathogenesis Informed the Development of Novel Treatments. *Digestive Diseases And Sciences*, 64(7), 1748-1758. <https://doi.org/10.1007/s10620-019-05646-y>
12. Sturgeon, C., y Fasano, A. (2016). Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. *Tissue Barriers*, 4(4), e1251384. <https://doi.org/10.1080/21688370.2016.1251384>
13. Chmielińska, M., Olesińska, M., Romanowska-Próchnicka, K., y Szukiewicz, D. (2021). Haptoglobin and Its Related Protein, Zonulin—What Is Their Role in Spondyloarthritis?. *Journal Of Clinical Medicine*, 10(5), 1131. <https://doi.org/10.3390/jcm10051131>
14. Wicher, K., y Fries, E. (2004). Prohaptoglobin is proteolytically cleaved in the endoplasmic reticulum by the complement C1r-like protein. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 101(40), 14390-14395. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405692101>
15. Tajik, N., Frech, M., Schulz, O., Schäfer, F., Lucas, S., y Azizov, V. et al. (2020). Targeting zonulin and intestinal epithelial barrier function to prevent onset of arthritis. *Nature Communications*, 11(1) 1995. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15831-7>
16. Lionta, E., Spyrou, G., Vassilatis, D. K. y Cournia, Z. (2014). Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: Principles, Applications and Recent Advances. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14: 1923. <https://doi.org/10.2174/1568026614666140929124445>
17. Ajamian, M., Steer, D., Rosella, G. y Gibson, P.R. (2019). Serum zonulin as a marker of intestinal mucosal barrier function: May not be what it seems. *PLoS ONE*, 14(1): e0210728. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210728>
18. Cai, X.-C., Kapilashrami, K., y Luo, M. (2016). Chapter eleven - synthesis and assays of inhibitors of ethyltransferases. *Methods in Enzymology*, 574: 245-308. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.01.009>
19. Pedelacq, J.D., Waldo, G.S. y Cabantous, S. (2019). High-Throughput Protein-Protein Interaction Assays Using Tripartite Split-GFP Complementation. *High-Throughput Protein Production and Purification. Methods in Molecular Biology*, vol 2025. Humana. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9624-7_20
20. Jiang, W.X., Dong, X., Jiang, J. et al. (2016). Specific cell surface labeling of GPCRs using split GFP. *Sci Rep* 6, 20568. <https://doi.org/10.1038/srep20568>
21. Cabantous, S. y Waldo, G. (2006). *In vivo* and *in vitro* protein solubility assays using split GFP. *Nat Methods* 3, 845-854. <https://doi.org/10.1038/nmeth932>
22. Paoletta, G., Caputo, I., Marabotti, A., Lepretti, M., Salzano, A. M., Scaloni, A., Vitale, M., Zambrano, N., Sblattero, D., y Esposito, C. (2013). Celiac Anti-Type 2 Transglutaminase Antibodies Induce Phosphoproteome Modification in Intestinal Epithelial Caco-2 Cells. *PloS one*, 8(12).

23. Hidalgo, I. J., Raub, T. J., y Borchardt, R. T. (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, 96(3): 736-49.
24. Khaleghi, S., Ju, M. J., Lamba, A., y Murray, A. J. (2016). The potential utility of tight junction regulation in celiac disease: focus on larazotide acetate. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 9(1): 37-49.
25. Srinivasan, B., Kolli, A. R., Esch, M. B., Abaci, H. E., Shuler, M. L., y Hickman, J. J. (2015). TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems. *Journal of Laboratory Automation*, 20(2):107-126.
26. Black, K. E., Murray, J. A., y David, C. S. (2002). HLA-DQ determines the response to exogenous wheat proteins: a model of gluten sensitivity in transgenic knockout mice. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 169(10), 5595–5600. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.10.5595>
27. Paterson, B. M., Lammers, K. M., Arrieta, M. C., Fasano, A., y Meddings, J. B. (2007). The safety, tolerance, pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of single doses of AT-1001 in coeliac disease subjects: a proof of concept study. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 26(5), 757–766. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03413.x>
28. Estudio de permeabilidad intestinal - Laboratorio Calderón. (2020, 16 noviembre). Laboratorio Calderon. <https://www.laboratoriocalderon.com/producto/estudio-de-permeabilidad-intestinal/>
29. Rao, A. S., Camilleri, M., Eckert, D. J., Busciglio, I., Burton, D. D., Ryks, M., Wong, B. S., Lamsam, J., Singh, R., y Zinsmeister, A. R. (2011). Urine sugars for in vivo gut permeability: validation and comparisons in irritable bowel syndrome-diarrhea and controls. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 301(5), G919–G928. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00168.2011>
30. Schuppan, D., Junker, Y., y Barisani, D. (2009). Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterology*, 137(6), 1912–1933. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.09.008>