



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA E INMUNOLOGÍA
CURSO ACADÉMICO 2022-2023

TRABAJO FIN DE GRADO

“ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LOS LINFOCITOS
INTRAEPITELIALES EN EL DUODENO HUMANO”

AUTORA: Mariama Cire Bah Bah

TUTOR: David Bernardo Ordiz

COTUTOR: Luis Fernández Salazar

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2-5
1.1. CONCEPTO Y EPIDEMIOLOGÍA DE ENFERMEDAD CELIACA	2
1.2. Diagnóstico	2-3
1.3. Implicación inmunológica de la IL-15, perforina y granzima B en la patogenia de la EC	3-4
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	5
2.1. Hipótesis	5
2.2. Objetivo principal	5
2.3. Objetivo secundario	5
3. MATERIAL Y MÉTODOS	6-10
3.1. Demografía	6
3.2. Población de estudio	6
3.3. Obtención de muestras	6
3.4. Material y equipamiento	6-7
3.5. Procesamiento de las muestras biológicas	7-9
3.6. Análisis de datos	9
4. RESULTADOS	10-16
4.1. Estrategia de identificación de linfocitos intraepiteliales	10-11
4.2. Titulaciones	11-12
4.3. Control de anticuerpo	13
4.4. Determinación intracelular de IL-15	13
4.5. Matriz de compensación	13
4.6. Determinación de los límites de positividad	14-15
4.7. Determinación de IL-15 en células mononucleares de sangre periférica	15
5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	16-17
6. CONCLUSIONES	18
7. BIBLIOGRAFÍA	19-20
8. GLOSARIO	21
9. MATERIAL COMPLEMENTARIO	22-27
10. AGRADECIMIENTOS	28

RESUMEN

Introducción: La enfermedad celiaca (EC) es una enteropatía inflamatoria crónica desencadenada por una respuesta anómala al gluten en individuos genéticamente susceptibles. Los linfocitos intraepiteliales (LIE) desempeñan un papel crucial en esta respuesta inmune, causando daño en la mucosa intestinal. Se sabe que la IL-15 y la toxicidad celular desempeñan un importante papel en la respuesta inmune frente al gluten, por ello creemos que son precisas más investigaciones sobre la expresión de IL-15 y su papel citotóxico en los LIE.

Objetivo: Desarrollar un panel de citometría que permita estudiar la actividad citotóxica de los LIE del duodeno humano medida por la expresión de IL-15, perforina y granzima B.

Métodos: Para la construcción del panel se emplearon biopsias duodenales y muestras de sangre periférica de donantes. Las muestras fueron procesadas para los aislamientos de los LIE y de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Posteriormente, las células fueron cultivadas y estimuladas con LPS e IL-15, y se realizaron tinciones de citometría intra y extracelular. Las muestras fueron adquiridas en el citómetro de flujo Gallios FC500 (Beckman Coulter) y los resultados fueron analizados mediante el software FlowJo versión 10.8.1

Resultados: En la optimización del panel se ajustaron los límites de positividad para IL-15, perforina y granzima B. Se determinó que las diluciones 1/50 son las más adecuadas para la detección de estos marcadores. Sin embargo, resulta relevante destacar que no se han identificado poblaciones de LIE que expresen IL-15, granzima B y perforina usando citometría de flujo, tanto en condiciones basales como en presencia de estimulación.

Conclusión: Se descarta como modelo para el estudio de la citotoxicidad de los LIE tanto la tinción extracelular de la IL-15 como la tinción intracelular de granzima B, y perforina mediante citometría de flujo en los LIE.

Palabras clave: Enfermedad celiaca, linfocitos intraepiteliales, citometría de flujo, IL-15, perforina, granzima B.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 CONCEPTO Y EPIDEMIOLOGÍA DE ENFERMEDAD CELIACA

La enfermedad celiaca (EC) es una enteropatía inflamatoria crónica de carácter multiorgánico mediada por el sistema inmune y desencadenada por una respuesta anómala al gluten de la dieta en individuos genéticamente susceptibles portadores del alelo HLA (antígenos leucocitarios humanos, su acrónimo en inglés HLA, Human Leukocyte Antigen) tipo II DQ2/DQ8 (1,2).

El gluten es un complejo proteico constituido por varios péptidos inmunógenos no digeribles, presentes en una gran variedad de cereales (trigo, avena, cebada, centeno) (3) siendo las prolaminas (gliadina-trigo, secalina-centeno, hordeina-cebada) las principales proteínas responsables de la respuesta autoinmune mediada por linfocitos T (4).

La evidencia actual pone de manifiesto un aumento global de la prevalencia de la EC. Se estima una prevalencia mundial de entre un 0,5 y 1,5%, siendo más frecuente entre las mujeres que entre varones (1).

En las últimas décadas la EC se ha convertido en un importante problema de salud pública, no solamente en países occidentales donde la incidencia es mayor, sino también en países como América del Sur, Asia y Oceanía (5). Además, puede expresarse en todas las edades de la vida, a través de un espectro variable de signos y síntomas intestinales y extraintestinales como resultado de la activación inmunológica y daño intestinal (1).

Hace unas décadas la mayoría de los diagnósticos se realizaban en pacientes pediátricos y con manifestaciones orgánicas más severas. Sin embargo, actualmente la mayoría de los pacientes son adultos paucisintomáticos (6,7).

1.2 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico definitivo de la EC en adultos se establece con una serología positiva junto con una evidencia de atrofia de las vellosidades duodenales. Sin embargo, en caso de discordancia entre las pruebas anteriores (serología e histología) se debe recurrir a las pruebas genéticas de histocompatibilidad HLA (8). En cualquier caso, hasta la fecha el único tratamiento eficaz y disponible es la dieta exenta de gluten de por vida (7).

La biopsia intestinal sigue siendo un pilar fundamental para el diagnóstico de la EC en adultos (8).

La lesión histopatológica se categoriza de acuerdo con la clasificación recomendada por Marsh y modificada por Oberhuber, considerándose una lesión típica y diagnóstica de la EC un Marsh 3, definido como un aumento de los LIE acompañado con atrofia de las vellosidades duodenales. Marsh

1 se considera un aumento de los LIE sin atrofia de las vellosidades y Marsh 2 un aumento de los LIE en combinación con hiperplasia de las criptas duodenales (8).

En la actualidad, la mayoría de los laboratorios utilizan la citometría de flujo para el análisis histológico de las biopsias intestinales, es una herramienta altamente sensible y específica para el estudio de las células intraepiteliales del intestino delgado, por lo tanto, es de elección en el diagnóstico de la enfermedad celiaca (9).

Gracias a esta técnica se ha establecido el patrón de LIE típico de la enfermedad celiaca, caracterizado por un aumento de la TCR $\gamma\delta$ y un descenso de los linfocitos CD3 (10).

1.3 IMPLICACIÓN INMUNOLÓGICA DE LA IL-15, PERFORINA Y GRANZIMA B EN LA PATOGENIA DE LA EC

Cuando se digiere el gluten de forma incompleta se forman péptidos como la gliadina, rica en prolinas y glutaminas. Estas moléculas proteicas son digeridas parcialmente por las enzimas intestinales y, como consecuencia, se genera una situación de estrés sobre el epitelio intestinal, activando los mecanismos de la inmunidad innata y la producción de la IL-15 (11). Esta interleucina induce la proliferación y activación de los LIE T CD8, que expresan receptores propios de las células NK (*natural killer cells*): NKGD2 y CD94·NKG2A, cuyos ligandos son moléculas como MIC-A (HLA-I) y HLA-E, respectivamente, expresadas por los enterocitos ante situaciones de estrés (12). Como resultado, se produce una alteración de la función de la barrera intestinal por la apoptosis de los enterocitos, lo que permite el paso de estos péptidos grandes. La IL-15 también promueve la producción de IFN- γ y la citotoxicidad dependiente de proteínas citolíticas (perforinas y granzimas) (9,3).

Los péptidos inmunógenos, una vez procesados por la transglutaminasa tisular (TG2), son presentados por las células presentadoras de antígeno que expresan HLADQ2 y/o DQ8 a los linfocitos T CD4 específicos de la lámina propia. Los linfocitos T CD4 se diferencian hacia linfocitos Th1, que producen citocinas proinflamatorias como interleucina 2 (IL-2), interferón gamma (IFN γ) e interleucina 21 (IL-21), que favorecen, a su vez, los cambios en los LIE para que se comporten como células citotóxicas. Por otro lado, los CD4 activados colaboran con los linfocitos B en la producción de autoanticuerpos contra la TG2 (13). En este trabajo pretendemos sentar las bases para el posterior análisis de la IL-15, la perforina y la granzima B como factores inmunógenos mediadores del daño tisular en la EC.

1.3.1 Interleucina 15 (IL-15)

La IL-15 es una citocina proinflamatoria, de la familia de citocinas de tipo I que se asocian con otras como la IL-2, IL-7 e IL-21, cuya principal función es el control de la homeostasis inmunitaria mediante

la regulación de la activación y proliferación de los linfocitos T citotóxicos, neutrófilos, mastocitos y las células NK (*natural killer cells*) (11). Por lo tanto, en la patogenia de la EC está implicada tanto la inmunidad innata como la inmunidad adaptativa (14).

La IL-15 ejerce varias funciones biológicas esenciales para un correcto mantenimiento y funcionamiento de múltiples tipos celulares, motivo por el cual su expresión está sujeta a una estricta regulación (15). Cabe señalar su papel sobre las células NK, donde promueve su desarrollo, diferenciación y citotoxicidad, favoreciendo la expresión de interferón gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), de igual modo, que en los linfocitos T CD8 promueve la proliferación y el desarrollo de memoria inmunológica (16).

De modo similar a lo descrito anteriormente, a nivel intestinal la IL-15 promueve la supervivencia de las células T TCR $\alpha\beta$ CD8 $\alpha\alpha$ y TCR $\gamma\delta$, favoreciendo la integridad epitelial y reparación de daño (17). Sin embargo, en procesos inflamatorios, como en el caso de la EC, la IL-15 parece aumentar la capacidad citolítica de las células T TCR $\alpha\beta$ CD8 $\alpha\alpha$ y TCR $\gamma\delta$ al incrementar la expresión de moléculas de estrés y de receptores de células NK en los LIE (NKG2 /CD94-NKG2A). Estos receptores NK median la destrucción de las células epiteliales al reducir el umbral de activación de los LIE y al mediar directamente la citólisis independiente de células T citotóxicas, hecho fundamental en la patogenia de la EC. (17,18). Además, se ha demostrado el incremento de la expresión de IL-15 y células citotóxicas en el intestino de pacientes con EC (11).

1.3.2 **Granzima B y perforina**

Tanto la perforina como la granzima B pertenecen a la familia de serina proteasas que se almacenan en los gránulos de linfocitos T y células NK. Son mediadores de la citólisis a través de los linfocitos T citotóxicos y linfocitos NK (19).

El mecanismo de acción de las perforinas es la integración en la membrana de la célula para inducir la formación de poros que causan la lisis osmótica de la célula diana. En cambio, las granzimas penetran en la célula por endocitosis y producen la apoptosis celular a través de la activación de caspasas (20).

Hay un amplio conocimiento en la literatura acerca del papel de los receptores NKG2 /CD94 y de la IL-15 en la inmunopatogenia de la EC, sin embargo, de acuerdo con la evidencia disponible hasta la fecha, no se ha evaluado el papel citotóxico de la granzima y perforina en la patogenia de la EC. Por este motivo, en el presente trabajo se plantea planteamos evaluar la expresión de IL-15, perforina y granzima B en muestras duodenales de pacientes con enfermedad celiaca.

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

Nuestra hipótesis es que el estudio de la actividad citotóxica de los LIE del duodeno humano permitirá identificar nuevos biomarcadores con utilidad diagnóstica y profundizar en las bases patogénicas que subyacen al desencadenamiento de la EC.

2.2 OBJETIVOS

El objetivo primario que se plantea en este trabajo es desarrollar un panel sencillo de citometría que permita estudiar la actividad citotóxica de los LIE del duodeno humano, medida por la expresión de IL-15, perforina y granzima B. Para ello, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Titulación de la dosis óptima de IL-15, perforina y granzima B en el panel de citometría.
- Creación de una matriz de compensación para este panel con todos los marcadores.
- Determinación de los límites de positividad de los distintos marcadores en este panel.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 DEMOGRAFÍA

Las muestras duodenales fueron obtenidas de un total de 16 individuos (10 mujeres y 6 varones) que acudieron a la consulta del Servicio de Gastroenterología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid para realizarse una endoscopia en el contexto de la práctica clínica. La toma de biopsias se realizó en 14 sujetos (10 mujeres y 2 varones) y las muestras de sangre periférica fueron donaciones de 2 varones. La edad media de los participantes en el momento de la toma de muestras fue de 47 años, 40 años entre las mujeres y 58 años entre los varones.

3.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se utilizaron muestras procedentes del duodeno de diversos pacientes sometidos a una endoscopia en el servicio de Gastroenterología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid en el contexto de la práctica clínica habitual para el diagnóstico o seguimiento de la EC.

3.3 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de cada uno de los pacientes participantes y dicho consentimiento fue aprobado en el contexto del proyecto con código PI_GR_20_1980 por el Comité Ético de investigación con medicamentos (CEIm) del Área de salud de Valladolid Este. A su vez, se utilizaron muestras de sangre periférica obtenidas de donantes del Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Valladolid.

Las biopsias obtenidas se preservaron en medio de cultivo RPMI (Medio completo de cultivo *Roswell Park Memorial Gibco*) a 4°C en el hospital donde fueron extraídas. Tras su traslado al laboratorio, parte de las muestras fueron criopreservadas en medio de congelación a -80°C (90% disolución tampón salina y 10% dimetilsulfóxido) y pasadas 24h se trasladaron a nitrógeno líquido. Para el presente trabajo se utilizaron tanto muestras frescas como muestras criopreservadas.

3.4 MATERIALES Y EQUIPAMIENTO

El material y equipamiento de laboratorio utilizados en los experimentos fueron los siguientes:

3.4.1 Materiales

Pipetas Pasteur (Fisherbrand); Micropipetas (Gilson); Tubos Falcon-15 y de 50ml (Corning Corning); Tubos citometría 5mL polipropileno Falcon-A (Coming Brand); Placa Petri (Corning); Puntas pipetas (Fisherbrand); Placa de pocillos de superficie plana de cultivo (Flat delta Surface).

3.4.2 Equipos

Agitador tipo Vortex (Heldolph Reax Top); Microcentrífuga "Centrifuge 5424R" (Eppendorf); Centrífuga "Rotanta 460R" (Hettich Zentrifugen); Agitador tipo Shaker "MaxQ 4000" (Barnstead Lab-

Line); Campana de extracción (Thermo Scientific MSC Advantage 1.2); Baño Térmico (BWhendigen w6); Citómetro de flujo (Citómetro Gallios, Beckman detectores Coulter, 3 láseres y 10).

3.5 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

3.5.1 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

El procedimiento se realizó bajo condiciones de esterilidad partiendo de una muestra de capa leucoplaquetaria. Se realizó una dilución del volumen de sangre en solución PBS (disolución tampón salina sigma-Aldrich) estéril se obtuvieron las CMSP mediante un gradiente discontinuo: con ayuda de una pipeta pasteur se añadió la solución de sangre-PBS sobre el volumen de Ficoll-Paque Plus en proporción 3:1. Posteriormente, se centrifugó a 800g durante 30 minutos, 4°C sin freno, y se recogió el halo de células creado en la fase entre el plasma y el ficoll.

Finalmente, se centrifugó diluido en 10ml de RPMI durante 5 minutos 4°C a 400g con freno.

3.5.2 Aislamiento de linfocitos intraepiteliales (LIE)

Se utilizaron biopsias duodenales criopreservadas en medio de congelación y conservadas en un tanque de nitrógeno líquido. Los crioviales se descongelaron en un baño a 37°C. Posteriormente, las biopsias se pasaron a una placa Petri con HBSS (solución salina equilibrada Thermo Scientific Pierce Hanks Gibco). Con ayuda de una pipeta pasteur, las muestras se pasaron a un tubo falcon de 15ml con 5ml del medio de aislamiento de LIE, DTT (Ditiotreitol) /EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético disódico) (1mM DTT y 1mM solución de EDTA en RPMI).

A continuación, se incubó durante 30 minutos a 37°C y 250rpm en un agitador orbital. Después, se transfirió la solución a un falcon de 50ml mediante un filtro celular de 100µm.

Se repitió la incubación del tejido residual en el agitado orbital y posteriormente se filtró la solución con una malla de 100µm. Por último, la solución obtenida en ambas incubaciones se centrifugó a 400g durante 5 minutos a 4°C con freno, se aspiró el sobrenadante y posteriormente se resuspendió el pellet agitando en el vórtex durante 10 segundos.

3.5.3 Cultivo celular

En los experimentos de estimulación, tanto con las muestras duodenales como con CMSP, se cultivaron 1×10^6 células/ml en AIM-V (*Serum Free medium*, Gibco) en placas de 24 pocillos. La incubación se realizó durante 18h a 37°C, 5% CO₂ con LPS (dilución 1:10) e IL-15 como factores estimulantes.

En las últimas 4h de incubación se añadió monensina (BioLegend) 1X en cada uno de los pocillos.

3.5.4 Tinción extracelular.

La suspensión celular se llevó a 1ml de volumen con FACS buffer (Disolución de citometría: 1 mM de etilendiaminotetraacético disódico y 0.02% azida sódico en Disolución tampón salina) y con ayuda de una pipeta se traspasó el contenido celular a un tubo de citometría.

Seguidamente se añadió 0,5µl de tinción de viabilidad celular, (LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit), y se incubó durante 30s a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó durante 5 minutos a 400g, 4°C con freno, se retiró el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió.

Después, se bloquearon las uniones inespecíficas mediante la incubación de las células en una dilución de 100µl de FACS-buffer y 2µl de FcBlock (tinción bloqueante de receptores Fc, Becton Dickinson) durante 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.

Posteriormente, se lavó añadiendo 1ml de FACS-buffer, se centrifugó durante 5 minutos a 400g, 4 °C con freno, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular.

Para la tinción celular se añadieron 100µl de una suspensión de anticuerpos marcados con fluorocromos (Tabla1) diluidos en FACS Buffer. Se incubó durante 20 minutos a 4°C en oscuridad. Posteriormente se añadió FACS-buffer, se centrifugó durante 5 minutos a 400g, 4°C con freno. Tras retirar el sobrenadante, el pellet celular se resuspendió en 250µl de paraformaldehído al 2% (dilución de paraformaldehído Protocol al 10% con FACS buffer) se incubó durante 10 minutos a 4°C en oscuridad, para fijar las células. Nuevamente se lavó con tampón FACS-buffer.

Finalmente, el pellet celular se resuspendió en 500µl de FACS-buffer y se conservaron las células a 4°C hasta su adquisición en el citómetro de flujo.

Tabla 1. Tinción extracelular

Dilución	Fluorocromo	Marcador	Casa comercial	clon
50	FITC	Tγδ	BD	B1
800	PE-Cy7	CD45	BD	HI30 (RUO)
400	APC	CD3	BioLegend	HIT3a
200	BV510	CD8	BioLegend	RPA-T8
800	BV421	CD7	BD	M-T701
100	Alexa700	CD4	BioLegend	A161A1

3.5.5 Tinción intracelular

En los casos en los que se realizaron tinciones intracelulares, éstas se llevaron a cabo después de la tinción extracelular, pero antes de su fijación con paraformaldehído. Para ello se añadió una solución de FACS-buffer y se lavó (centrifugación durante 5 minutos a 400g, 4°C con freno). Tras

retirar el sobrenadante, se resuspendió el pellet de células en 100µl de reactivo A (FIX & PERM MEDIUM A Life Technologies) para fijar la tinción extracelular y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Tras este tiempo, se lavó nuevamente en tampón FACS-buffer.

Posteriormente, el pellet celular se resuspendió en 100ul de una suspensión de anticuerpos diluidos en Reactivo B (FIX & PERM MEDIUM B Life Technologies) (tabla 2), y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, se lavó nuevamente aplicando la misma metodología descrita previamente

Tabla 2. Tinción intracelular

Dilución	Fluorocromo	Marcador	Casa comercial	Clon
50	PerCP Cy5.5	Perforina	BioLegend	dG9
50	PE Dazzle 594	Granzima B	BioLegend	QA16A02
50	PE	IL-15	RD	34559

3.6 ANÁLISIS DE DATOS

La adquisición de las tinciones se realizó en el citómetro de flujo Beckman Coulter Gallios FC500, cuyos resultados fueron analizados mediante el software FlowJo versión 10.8.1. En todos los casos se realizó un análisis funcional y fenotípico los LIE.

4 RESULTADOS

4.1 ESTRATEGIA DE IDENTIFICACIÓN DE LINFOCITOS INTRAEPITELIALES (LIE).

Para el análisis se adquirieron todas las muestras en el citómetro de flujo Gallios FC500 (Beckman Coulter) y se analizaron con medidas directas para obtener información sobre el tamaño celular (FS), la complejidad o granularidad celular (SS) y fluorescencia (FL). Se utilizó el software FlowJo 10.3 para el análisis de datos. Para mejorar la precisión en la identificación de la población de LIE y distinguirla de otras subpoblaciones linfocitarias presentes en la muestra, se llevaron a cabo una serie de acotaciones denominadas "gatings". Estos procedimientos analíticos permitieron obtener datos más precisos y confiables para el posterior análisis y la interpretación de los resultados.

La estrategia de identificación de las poblaciones de interés se muestra en la figura 1. En primer lugar, se identificó la población leucocitaria como CD45 y baja granularidad, posteriormente se descartaron los dobletes y finalmente se seleccionaron las células viables.

En el análisis de leucocitos, fue necesario realizar la discriminación de dobletes y selección de singletes (*fig. 1*). Para ello, se seleccionaron los LIE vivos mediante la tinción de viabilidad para teñir las células muertas. Este procedimiento es importante, ya que las células no viables pueden interferir con los resultados. La subpoblación negativa representa las células vivas, mientras que la positiva representa las células muertas. Por último, dentro de la fracción de LIE viables, identificamos las células CD3 y $T\gamma\delta$ (*fig. 2*), dentro de las cuales se determinará la expresión de IL-15, granzima B y perforina mediante la titulación.

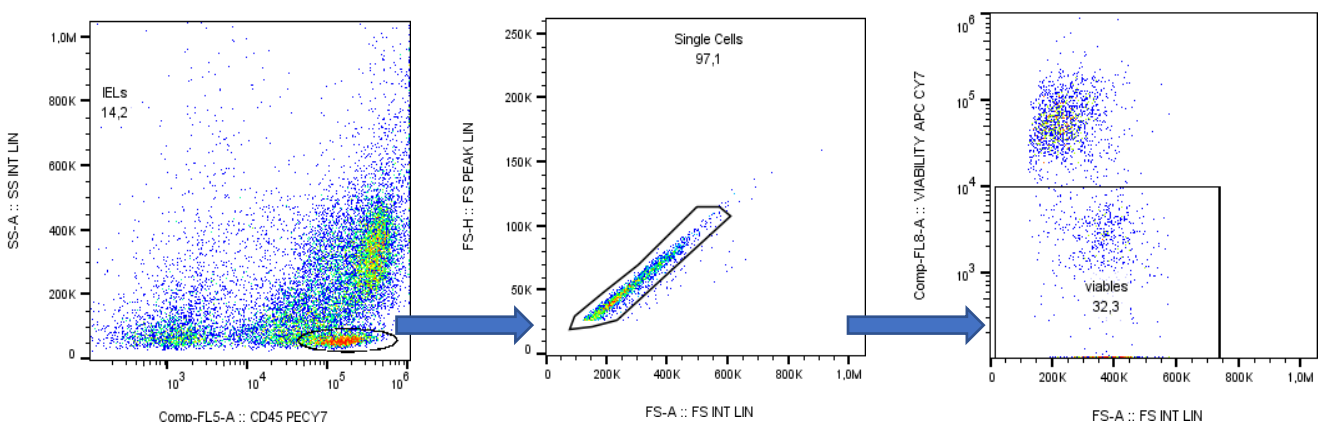


Figura.1: ESTRATEGIA DE IDENTIFICACIÓN DE LOS IEL: A) Caracterización de leucocitos con el marcador CD45. B) Discriminación de dobletes y selección de singletes. C) Identificación de células viables (viabilidad-)

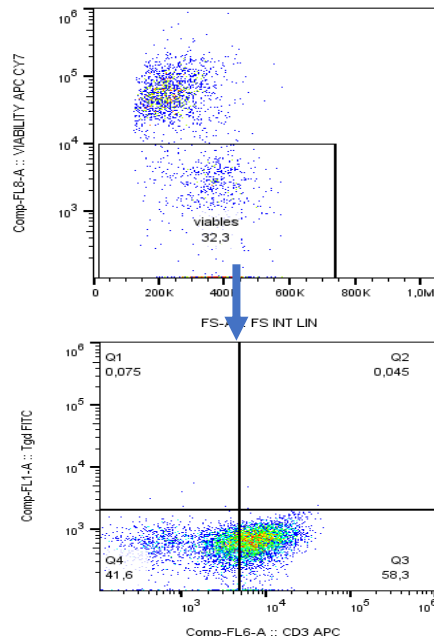


Figura2: ESTRATEGIA DE IDENTIFICACIÓN CD3 Y $T\gamma\delta$.

4.2 TITULACIONES.

Para la optimización del panel se determinó la concentración adecuada de anticuerpo necesaria para observar la expresión de los marcadores bajo estudio. En este caso, la IL-15, Granzima B y perforina son los únicos anticuerpos del panel que no estaban ya en uso y, por tanto, titulados por el laboratorio. Los resultados de las diluciones seriadas de 1:50; 1:100; 1:200; 1:400; 1:800, se recogen en la figura Suplementaria 1. Dado que para las 3 moléculas los mayores niveles de expresión se encontraban a la dilución 1:50, fue esta la que se tomó como referencia óptima para realizar los experimentos, como se muestra en la Figura 3.

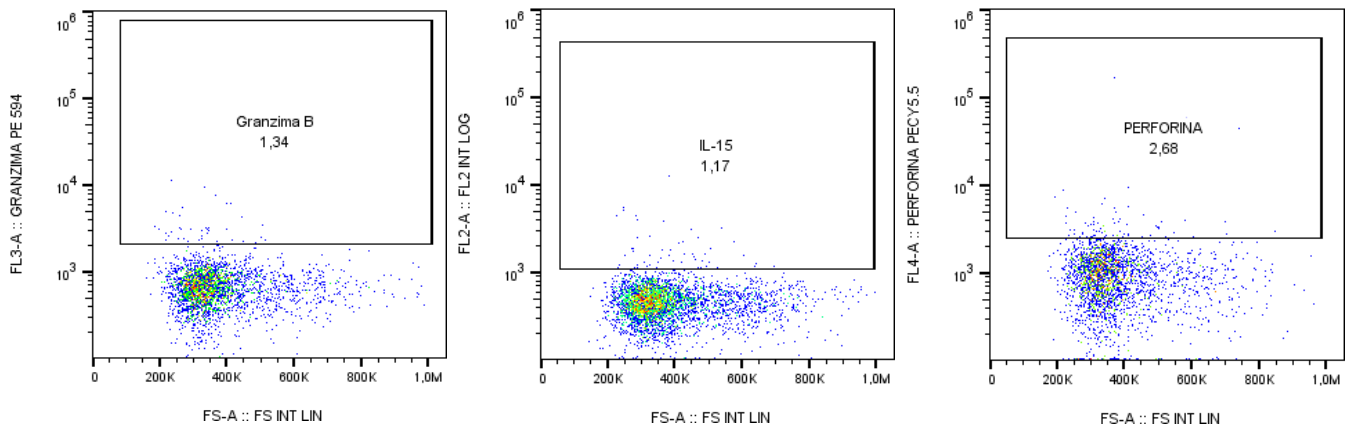


Figura.3: TITULACIONES DILUCIÓN 1:50: Granzima B; IL-15; perforina.

Sin embargo, y dada la baja expresión Granzima B IL-15 y perforina observada en la primera titulación, se llevaron a cabo nuevas titulaciones utilizando estímulos (LPS e IL-15) y ampliando el número de diluciones (1:10; 1:25; 1:50; 1:100) (Figura Suplementaria 2). Sin embargo, los resultados de estas titulaciones mostraron una vez más una baja expresividad en todos los casos y sin diferencias significativas entre las distintas diluciones.

Para estimular las células, se utilizaron LPS en dos concentraciones diferentes (100 ng/ml y 200 ng/ml) y también se utilizó IL-15 en una concentración de 50 ng/ml (Fig. 4, 5 y 6). Se observó que, al estimular las células con LPS 100 ng/ml, la visibilidad disminuye a medida que la concentración se reduce, pero no se aprecian diferencias significativas entre las distintas concentraciones. Estos mismos resultados se observaron tanto cuando las células se estimularon con LPS 200 ng/ml como con IL-15 50 ng/ml. Por lo tanto, se decidió seleccionar la dilución estándar en citometría, que es la dilución 1:50, en todos los casos.

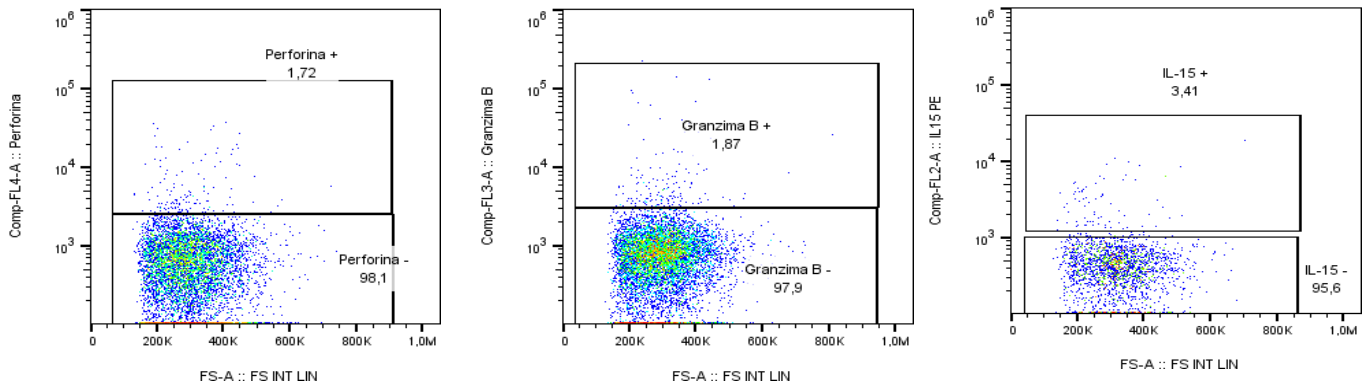


Figura4. TITULACIÓN CON ESTIMULACIÓN LPS 100 NG/ML. DILUCIÓN 1:50. Perforina. Granzima B. IL-15

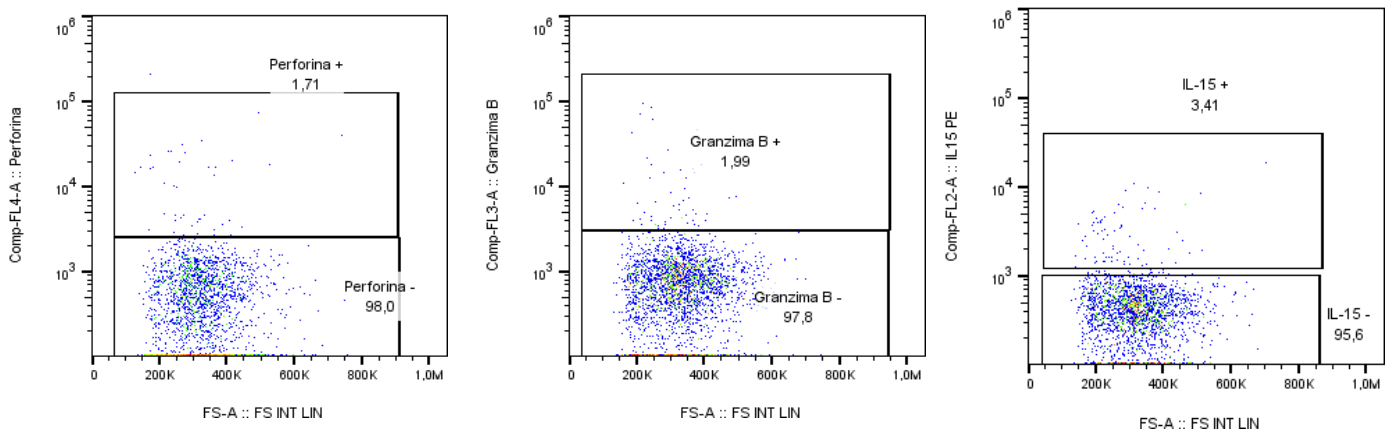


Figura.5: TITULACIÓN CON ESTIMULACIÓN LPS 200 NG/ML. DILUCIÓN 1:50 Perforina. Granzima B. IL-15

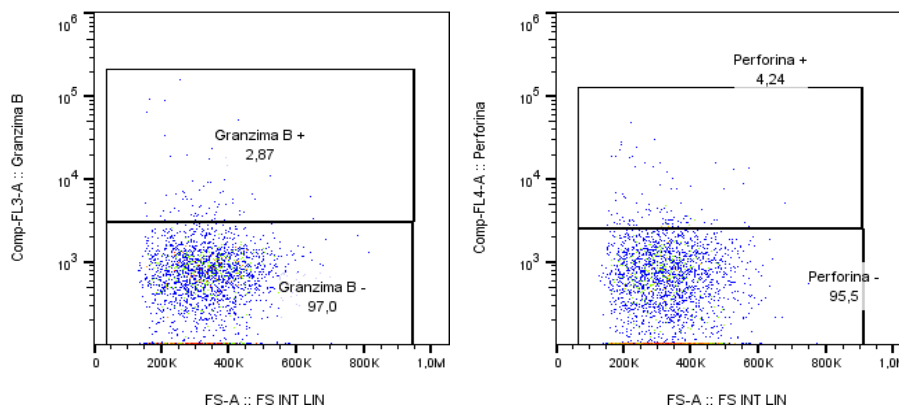


Figura.6: TITULACIÓN CON ESTIMULACIÓN IL-15 50 NG/ML. Dilución 1:50

4.3 CONTROL DE ANTICUERPO

Dada la baja expresión de citocinas observada en las muestras, se realiza una comprobación del correcto funcionamiento de uno de los anticuerpos: IL-15 PE. Tras comparar la expresión del mismo con IL-15 Alexa Fluor 594, se determina que el marcaje con IL-15 PE es fidedigno.

No se realizaron comprobaciones similares con los anticuerpos para las otras dos citocinas debido a falta de stock.

4.4 DETERMINACIÓN INTRACELULAR DE IL-15

Tras la ausencia de expresión extracelular de IL-15 apreciada hasta el momento, se planteó determinar si era más conveniente evaluar su expresión intracelular. Como resultados observamos una nula expresión en ambos casos, sin diferencia alguna entre ambos casos, como se puede apreciar en la figura 7.

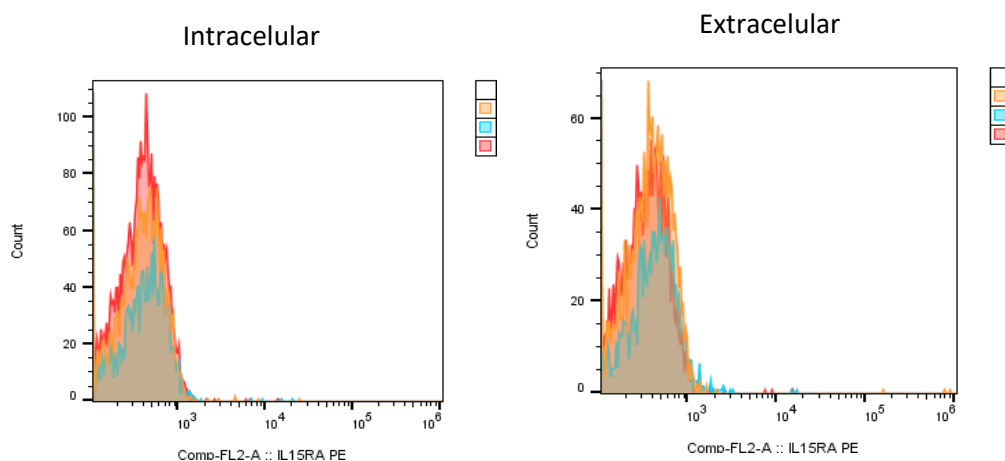


Figura.7: MARCAJE DE IL-15 INTRACELULAR Y EXTRACELULAR. Se representa el marcaje de IL-15 en IEL provenientes de 3 pacientes distintos (paciente 1 en color rojo, paciente 2 en color naranja y paciente 3 en color azul).

4.5 MATRIZ DE COMPENSACIÓN

Para eliminar la superposición espectral en nuestro panel de marcadores, realizamos una matriz de compensación. Para ello, se utilizó una serie de bolas de captura de antígenos para analizar individualmente 9 de los 10 marcadores del panel (FITC→Tgd, PE→IL-15PE-Dazzle 594→Granzima B, PerCP-CY5.5→Perforina, PE-Cy7→CD45, APC→CD3, BV510→CD8, BV421→CD7, Alexa700→CD4), en cuanto al marcador de viabilidad, se utilizó una mezcla de células vivas y muertas tras ser mantenidas a 95°C durante 5 minutos. De esta manera, se generó una matriz de compensación (Figura Suplementaria 3) mediante el software del citómetro, que permitió corregir las interferencias entre los diferentes canales. De esta forma, se garantizó la adecuada cuantificación de la intensidad de fluorescencia de cada fluoróforo.

4.6 DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES DE POSITIVIDAD.

Para la construcción y evaluación de paneles multicolor de citometría de flujo, es fundamental realizar controles de fluorescencia menos uno (FMOs, sus siglas en inglés). Esta técnica consiste en determinar dónde se van a fijar los límites de positividad de cada anticuerpo.

El procedimiento se basa en el marcaje de células con todos los anticuerpos conjugados menos uno, al se va a evaluar. De este modo, analizamos los límites de positividad de cada anticuerpo. En la figura 8, se pueden apreciar los controles FMOs de Tgd, CD45⁺ y en la figura 9, los límites de IL-15, perforina y granzima B.

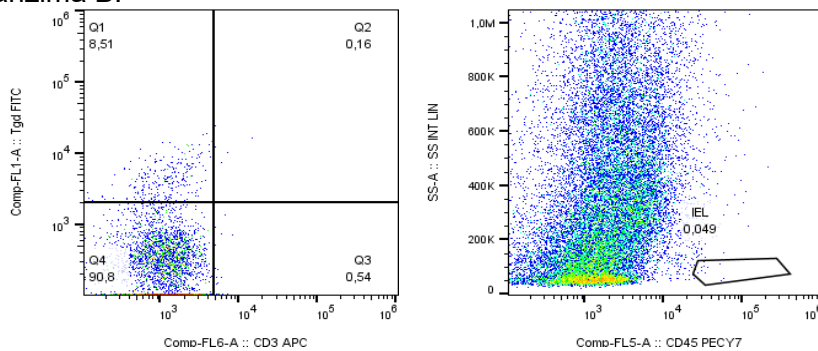


Figura.8 CONTROLES FMOs PARA MARCADOR CD3 y CD45.

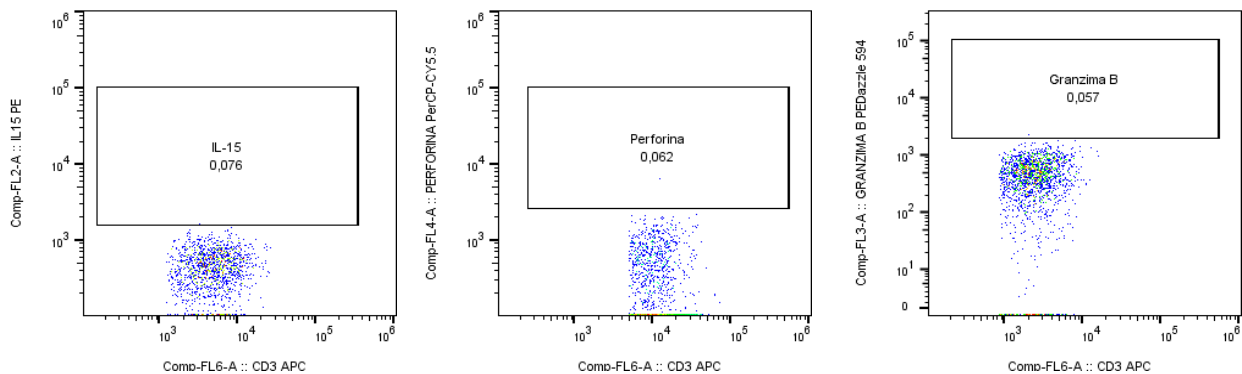


Figura.9: CONTROLES FMOs PARA LOS MARCADORES DE IL-15, PERFORINA y GRANZIMA B

En vista de la ausencia de una población positiva para IL-15 perforina y granzima B, se repite el ensayo añadiendo monensina, un bloqueador del transporte intracelular a nivel del aparato de Golgi, con la finalidad de mejorar la expresión de citocinas intracelulares cuando es añadido en las últimas horas del cultivo celular. En consecuencia, se añadió monensina durante las últimas cuatro horas del cultivo celular en una fracción de las células, sin embargo, no se apreció la presencia de perforina ni de granzima B en las células (fig. 10).

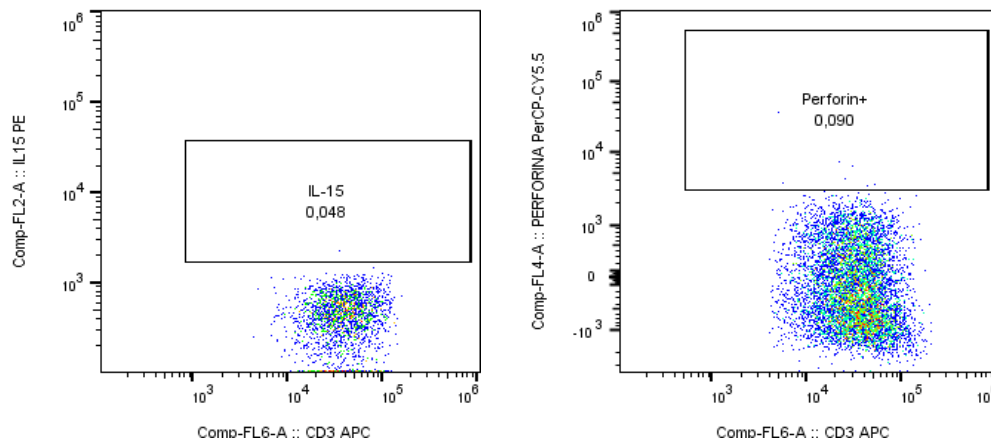


Figura.10: TINCIÓN CON FMOS DE CITOCINAS INTRACELULARES (GRANZIMA B Y PERFORINA) CON MONENSINA

4.7 DETERMINACIÓN DE IL-15 EN CMSP

Finalmente, para determinar si el marcaje de IL-15 extracelular mediante citometría de flujo puede aplicarse a muestras distintas de los LIE, analizamos su expresión en CMSP. En un segundo experimento se cultivaron las células con estímulo de 100 ng/ml de LPS, incluyendo un FMO de IL-15, en ambos casos se apreció baja expresión de IL-15 en las CMSP (*fig. 11*).

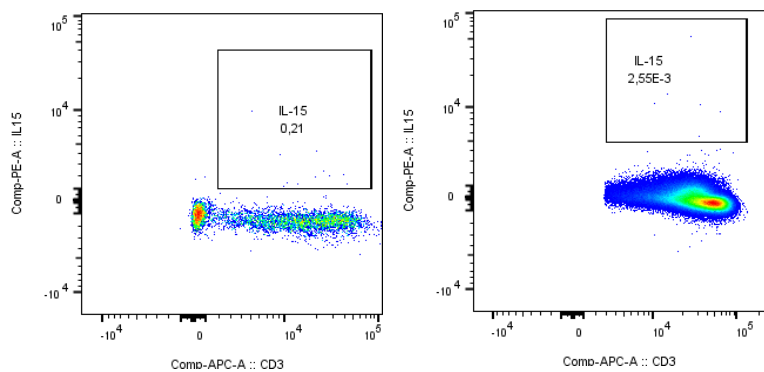


Figura 11. EXPRESIÓN DE IL-15 EN CMSP. Tinción FMO IL-15 en CMSP

5 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Este trabajo tuvo como objetivo desarrollar un panel sencillo de citometría de flujo para analizar la actividad citotóxica de los linfocitos intraepiteliales del duodeno humano, en relación con la expresión de las moléculas IL-15, perforina y granzima B, con el fin de encontrar nuevos biomarcadores para el diagnóstico de la enfermedad celiaca y profundizar en su origen inmunopatogénico.

Los resultados obtenidos muestran una baja expresividad de IL-15, perforina y granzima B en todos los casos. A pesar de realizar más titulaciones y utilizar diluciones más bajas, la expresión de los marcadores se mantuvo baja y sin hallar diferencias significativas entre las diferentes concentraciones. De este modo, en este trabajo no se ha podido demostrar que la estimulación con LPS e IL-15 favorezca la liberación de marcadores de citotoxicidad celular en LIE y en CMSP. No obstante, otros trabajos han asociado la sobreexpresión de IL-15 en LIE con la inmunopatogenia de la enfermedad celiaca y la activación de células T intraepiteliales en la mucosa intestinal de pacientes en EC (11, 21, 22).

De igual modo, un estudio realizado por Di Sabatino *et al.* (23) demostró que la estimulación con IL-15 mejoró significativamente la liberación de granzima B (IL-15) en pacientes con EC no controlada, y que la presencia de IL-15 en LIE y CMSP era significativamente mayor en estos pacientes. Además, otros estudios también han demostrado que la expresión moléculas citotóxicas, puede estar aumentada en LIE de pacientes con EC tras la estimulación con IL-15 (24, 25).

Además, por un lado, la ausencia de expresión intracelular de IL-15 lleva a cuestionarse la necesidad de añadir monensina para la visualización de los marcadores intracelularmente, sin embargo, los resultados del presente estudio indican que la falta de visualización de los marcadores no se debe a la falta de uso de monensina, por lo tanto, en futuros estudios se planteará la necesidad de añadir otros agentes bloqueadores del transporte intracelular, como la brefeldina o la cicloheximida.

Por otro lado, la comprobación del correcto funcionamiento de los anticuerpos es una medida de control importante que se debe implementar en los experimentos de inmunofenotipado celular. En este caso, se realizó una comprobación específica para el anticuerpo de IL-15 PE y este control se llevó a cabo para asegurarse de que la baja expresión de los marcadores observada en las muestras no era debido a un problema en el funcionamiento del anticuerpo.

El hecho de que se haya determinado que el marcaje con IL-15 PE es fidedigno, proporciona confianza en los resultados obtenidos y permite descartar la posibilidad de que los resultados negativos en la expresión de las moléculas sean debidos a un problema en la detección con anticuerpos. Sin embargo, el hecho de que no se hayan realizado comprobaciones similares con los anticuerpos para los otros dos marcadores debido a la falta de stock ~~es~~ constituye una limitación del estudio. La falta de control en la detección de estas moléculas puede generar cierta incertidumbre

en la interpretación de los resultados. Por lo tanto, en futuros trabajos es recomendable contar con suficiente stock de los anticuerpos necesarios para realizar los controles necesarios y asegurar la validez de los resultados obtenidos.

Aunque los resultados obtenidos no son concluyentes para el desarrollo del panel de citometría que permita estudiar la actividad citotóxica de los LIE del duodeno humano, la construcción de una matriz de compensación y la determinación de los límites de positividad con FMOs son pasos esenciales en el desarrollo de un panel de citometría de flujo para el análisis de linfocitos intraepiteliales (26) y pueden mejorar significativamente la precisión y la fiabilidad de los resultados obtenidos en el análisis de estas células, por lo tanto, son fundamentales para el diagnóstico inmunopatológico de la enfermedad celíaca y otros trastornos relacionados con el sistema inmunológico.

Existen múltiples evidencias que respaldan la producción de IL-15, perforina y granzima B por los LIE, y la posibilidad de detectarlos tanto a nivel genómico como a nivel proteico. Por ejemplo, un estudio realizado por Meresse et al. (25) utilizando técnicas de inmunohistoquímica, demostró la presencia de estos marcadores en células intraepiteliales de pacientes con EC. Además, varios estudios han utilizado PCR en tiempo real para demostrar la expresión de estos genes en los linfocitos intraepiteliales (27,28). En relación con esto, en futuros estudios sería conveniente comprobar mediante ELISA (por su acrónimo del inglés Enzyme-Linked-Immuno Sorbent-Assay) la expresión de estas proteínas en células intraepiteliales, de igual modo, para mejorar la sensibilidad de la detección, se recomienda el uso de un anticuerpo secundario para amplificar la señal y así lograr el objetivo deseado.

6 CONCLUSIÓN

Con los resultados obtenidos en este estudio, se descarta la tinción extracelular de IL-15 y la tinción intracelular de granzima B y perforina mediante citometría de flujo en los linfocitos intraepiteliales como modelo para el estudio de la citotoxicidad.

Sin embargo, es importante tener en cuenta que esta conclusión se basa en los experimentos realizados en este estudio en concreto. Se necesitarían más investigaciones para determinar cuál es la mejor manera de evaluar la expresión de IL-15, perforina y granzima B en la enfermedad celíaca.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Levescot A, Malamut G, Cerf-Bensussan N. Immunopathogenesis and environmental triggers in coeliac disease. *Gut*. 2022 Jul 25;71(11):2337-2349. doi: 10.1136/gutjnl-2021-326257.
2. Elli L, Branchi F, Tomba C, Villalta D, Norsa L, Ferretti F, Roncoroni L, Bardella MT. Diagnosis of gluten related disorders: Celiac disease, wheat allergy and non-celiac gluten sensitivity. *World J Gastroenterol* 2015; 21(23): 7110-7119 [PMID: 26109797 DOI: 10.3748/wjg.v21.i23.7110].
3. Caio G, Volta U, Sapone A, Leffler DA, De Giorgio R, Catassi C, et al. Celiac disease: a comprehensive current review. *Med*. 2019 Dec 23;17(1):142. Disponible en: <https://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-019-1380-z>
4. Rojas Vargas C. Celiac disease: an autoimmune disease. *Revista Médica Sinergia* Vol.6, Núm. 4, abril 2021.- ISSN:2215-4523 / e-ISSN:2215-5279. Disponible en: <http://revistamedicasinergia.com>
5. Singh P, Arora A, Strand TA, Leffler DA, Catassi C, Green PH, Kelly CP, Ahuja V, Makharia GK. Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2018 Jun;16(6):823-836.e2. doi: 10.1016/j.cgh.2017.06.037.
6. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PH, Hadjivassiliou M. et. al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*. 2013 Jan;62(1):43-52. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301346.
7. Elli L, Branchi F, Tomba C, Villalta D, Norsa L, Ferretti F, Roncoroni L, Bardella MT. Diagnosis of gluten related disorders: Celiac disease, wheat allergy and non-celiac gluten sensitivity. *World J Gastroenterol* 2015; 21(23): 7110-7119.DOI:10.3748/wjg. v21.i23.7110].
8. Raiteri A, Granito A, Giamperoli A, Catenaro T, Negrini G, Tovoli F. Current guidelines for the management of celiac disease: A systematic review with comparative analysis. *World J Gastroenterol*. 2022 Jan 7;28(1):154-175. doi: 10.3748/wjg. v28.i1.154.
9. Fernández-Bañares F, Carrasco A, Martín A, Esteve M. Systematic Review and Meta-Analysis: Accuracy of Both Gamma Delta+ Intraepithelial Lymphocytes and Coeliac Lymphogram Evaluated by Flow Cytometry for Coeliac Disease Diagnosis. *Nutrients*. 2019 Aug 23;11(9):1992. doi: 10.3390/nu11091992.
10. León F. Citometría de flujo de linfocitos intraepiteliales intestinales en la enfermedad celíaca. *J. Immunol. Métodos*. 2011; 363 :177–186. doi: 10.1016/j.jim.2010.09.002.
11. Bernardo D, Garrote JA, Allegretti Y, León A, Gómez E, Bermejo-Martin JF, et al. Higher constitutive IL15R α expression and lower IL-15 response threshold in coeliac disease patients. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2008 oct;154(1):64–73. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18821940>
12. Rodrigo L, Garrote JA, Vivas S. Enfermedad celíaca. *Med Clin (Barc)* [Internet]. 2008 Sep;131(7):264–70. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025775308722474>.
13. Caillat-Zucman S. How NKG2D Ligands Trigger Autoimmunity? *Hum Immunol* [Internet]. 2006 Mar;67(3):204–7. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0198885906000346>
14. Kara Y, Eren M, Arslan S, Çilingir O. IL-15 Gene Polymorphism in Celiac Disease Patients and Their Siblings. *Turk J Gastroenterol*. 2021 Apr;32(4):349-356. doi: 10.5152/tjg.2021.19083.

15. Abadie V, Jabri B. IL-15: a central regulator of celiac disease immunopathology. *Immunol Rev.* 2014 Jul;260(1):221-34. doi: 10.1111/imr.12191.
16. Cassatella MA, McDonald PP. Interleukin-15 and its impact on neutrophil function. *Curr Opin Hematol.* 2000 May;7(3):174-7. doi: 10.1097/00062752-200005000-00008.
17. Abadie V, Jabri B. IL-15: a central regulator of celiac disease immunopathology. *Immunol Rev.* 2014 Jul;260(1):221-34. doi: 10.1111/imr.12191.
18. Maiuri L, Ciacci C, Vacca L, Ricciardelli I, Auricchio S, Quarantino S, Londei M. IL-15 drives the specific migration of CD94+ and TCR-gammadelta+ intraepithelial lymphocytes in organ cultures of treated celiac patients. *Am J Gastroenterol.* 2001 Jan;96(1):150-6. doi: 10.1111/j.1572-0241.2001.03437.x.
19. Cai SF, Fehniger TA, Cao X, Mayer JC, Brune JD, French AR, Ley TJ. Differential expression of granzyme B and C in murine cytotoxic lymphocytes. *J Immunol.* 2009 May 15;182(10):6287-97. doi: 10.4049/jimmunol.0804333.
20. Natalia A. Taborda, Juan C. Hernández, Carlos J. Montoya y María T. Rugeles. Las células naturales killer y su papel en la respuesta inmunitaria durante la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo-1. *inmunología.* 2014;33(1):11–20. DOI: 10.1016/j.inmuno.2013.11.002.
21. Mention JJ, Ben Ahmed M, Bègue B, Barbe U, Verkarre V, Asnafi V, Colombel JF, et al. Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology.* 2003 Sep;125(3):730-45. doi: 10.1016/s0016-5085(03)01047-3
22. Abadie V, Jabri B. IL-15: a central regulator of celiac disease immunopathology. *Immunol Rev.* 2014 Jul;260(1):221–34. doi.wiley.com/10.1111/imr.12191
23. Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Cupelli F, Cinque B, Millimaggi D, Clarkson MM, Paulli M, Cifone MG, Corazza GR. Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease. *Gut.* 2006 Apr;55(4):469-77. doi: 10.1136/gut.2005.068684.
24. Ebert EC. Interleukin 15 is a potent stimulant of intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology.* 1998 Dec;115(6):1439-45. doi: 10.1016/s0016-5085(98)70022-8.
25. Meresse B, Korneychuk N, Malamut G, Cerf-Bensussan N. Interleukin-15, a masterpiece in the immunological jigsaw of celiac disease. *Dig Dis.* 2015;33(2):122-130. doi: 10.1159/000369521.
26. Szalóki G, Goda K. Compensation in multicolor flow cytometry. *Cytometry A.* 2015 Nov;87(11):982-5. doi: 10.1002/cyto.a.22736.
27. Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Bauer M, Della Riccia DN, Bizzini F, Biagi F, Cifone MG, Corazza GR, Schuppan D. Matrix metalloproteinase pattern in celiac duodenal mucosa. *Lab Invest.* 2005 Mar;85(3):397-407. doi: 10.1038/labinvest.3700225.
28. Magni S., Buoli Comani G., Elli L., Vanessi S., Ballarini E., Nicolini G., Rusconi M., Castoldi M., Meneveri R., Muckenthaler MU, et al. Los miARN afectan la expresión de proteínas de la inmunidad innata y adaptativa en la enfermedad celíaca. *Soy. J. Gastroenterol.* 2014; 109 :1662–1674. doi: 10.1038/ajg.2014.203

GLOSARIO DE TÉRMINOS

- EC: Enfermedad celiaca
- HLA: Antígenos leucocitarios humanos
- LIE: Linfocitos intraepiteliales
- CMSP: Células mononucleares de sangre periférica
- TCR $\gamma\delta$: Receptor de células T gamma-delta
- TCR $\alpha\beta$: Receptor de células T alfa-beta
- CD: Antígenos de diferenciación (cluster of differentiation, en inglés)
- IL-15: Interleucina 15
- IL-2: Interleucina 2
- IL-21: Interleucina 21
- Linfocitos NK: Linfocitos naturales killer
- NKGD2: Receptor activador de células natural killer grupo 2, miembro D
- IFN- γ : Interferón gamma
- TG2la: Transglutaminasa tisular A
- TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa
- FMOs: Controles de fluorescencia menos uno (Fluorescence Minus One, en inglés)
- PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
- ELISA: Enzimoimmuno análisis de adsorción (Enzyme-Linked-Immuno Sorbent-Assay, en inglés)

ANEXOS: MATERIAL SUPLEMENTARIO

Figura Suplementaria 1: Titulaciones de anticuerpos para IL-15, Granzima B y perforina con diluciones seriadas de 1:50; 1:100; 1:200; 1:400; 1:800.

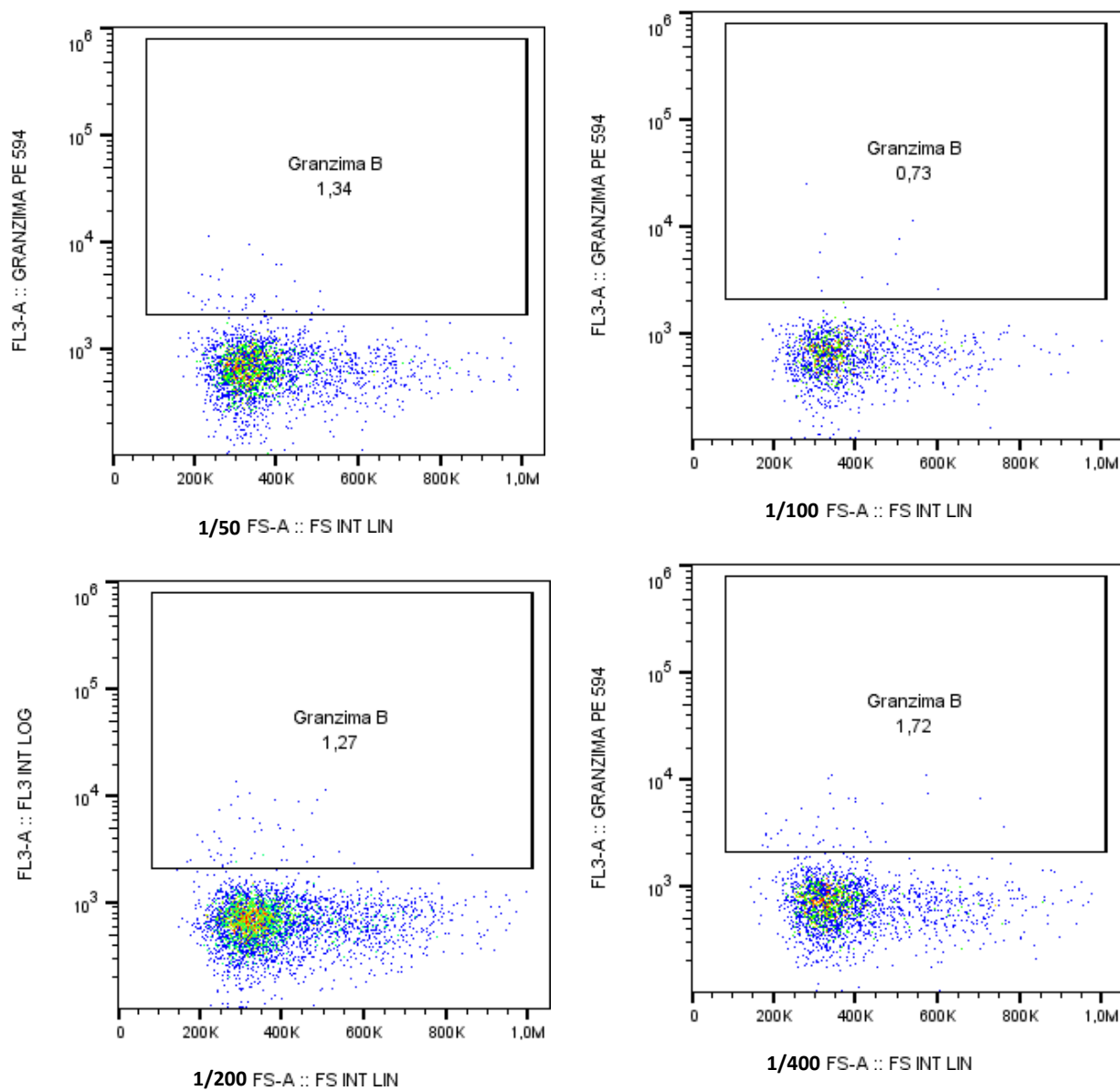


Figura Suplementaria 1.1: titulaciones granzima B

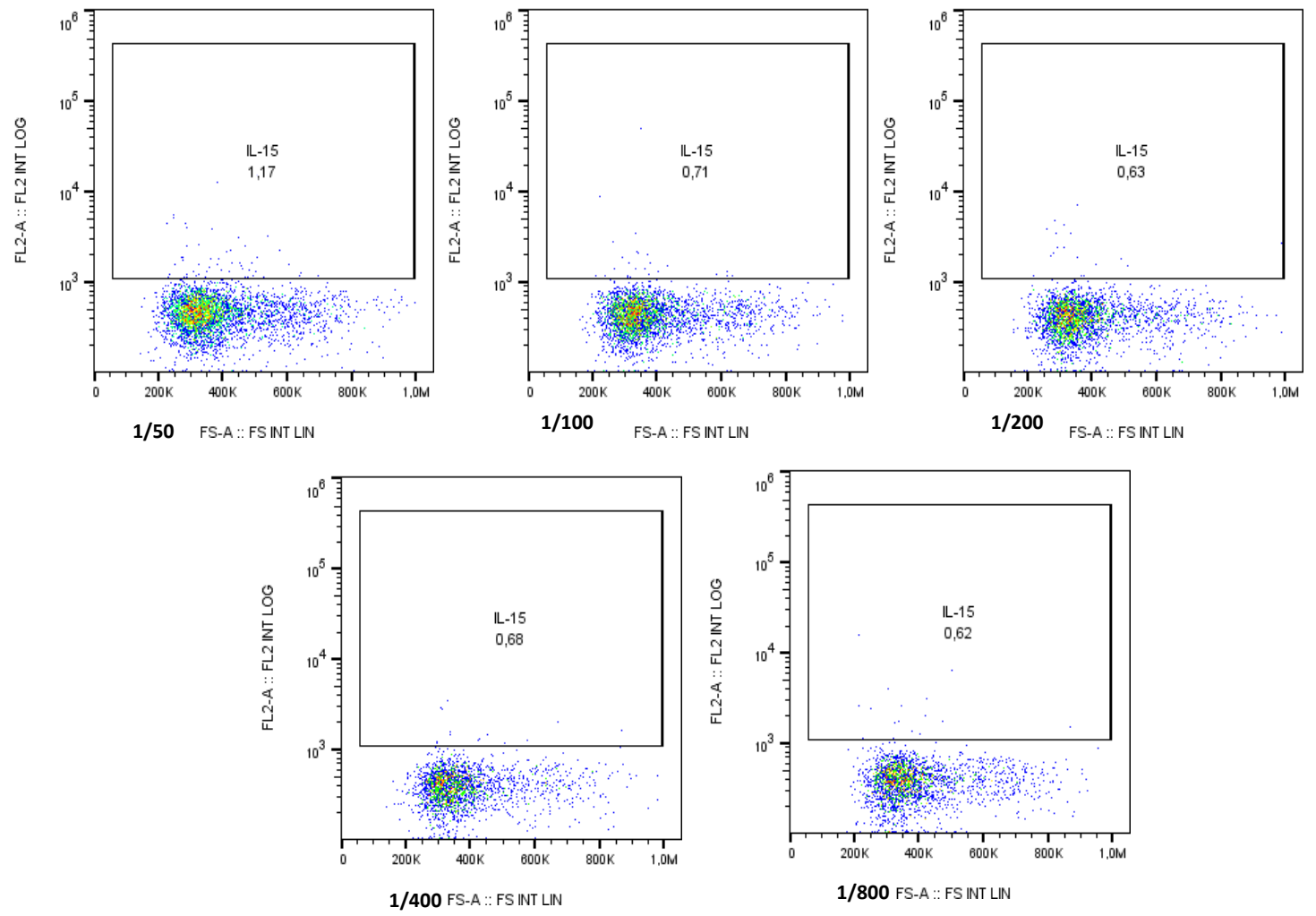


Figura Suplementaria 1.2: Titulaciones IL-15

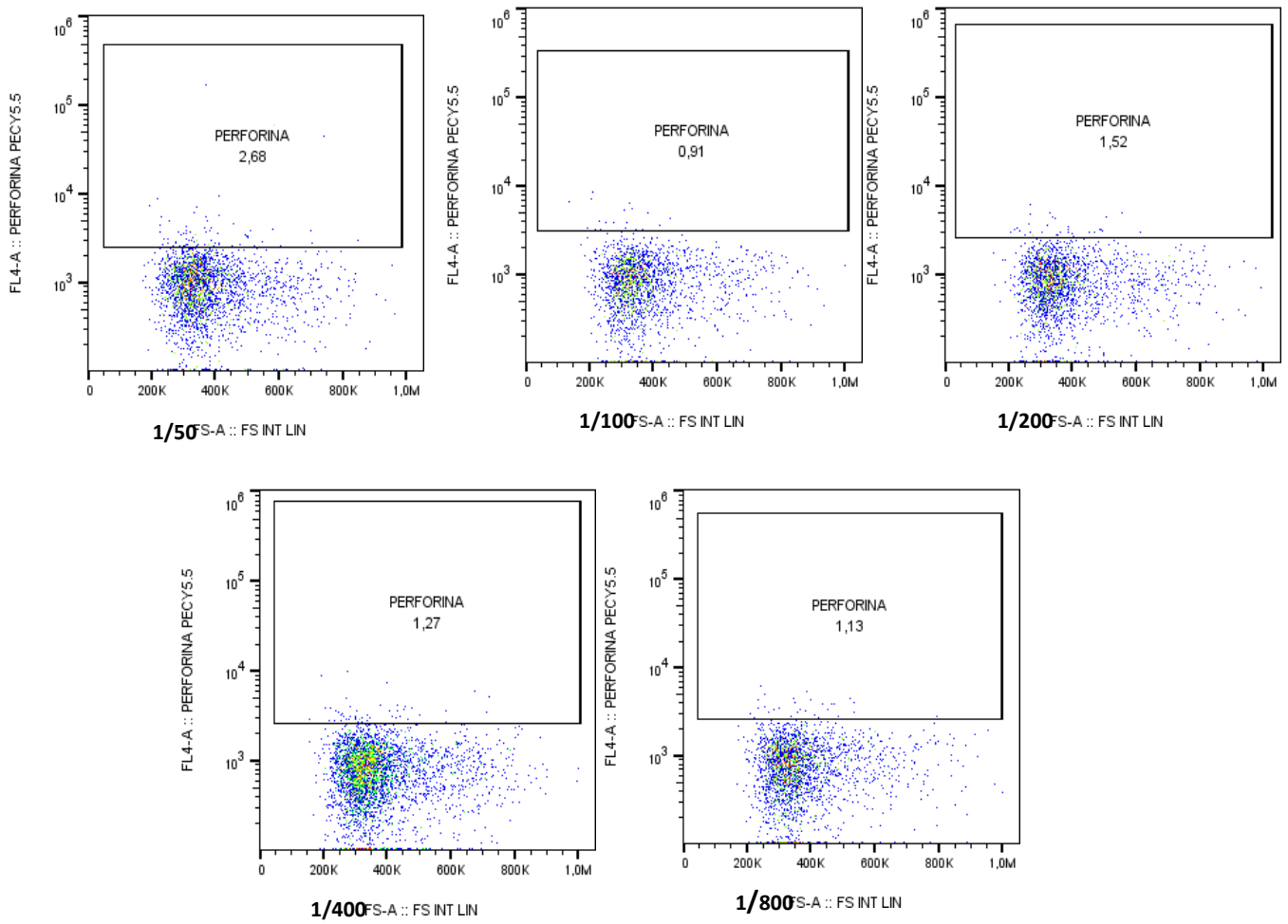


Figura Suplementaria 1.3: Titulaciones perforina.

Figura Suplementaria 2: Titulaciones de anticuerpos para Granzima B y perforina con diluciones seriadas de 1:10; 1:25; 1:50; 1:100.

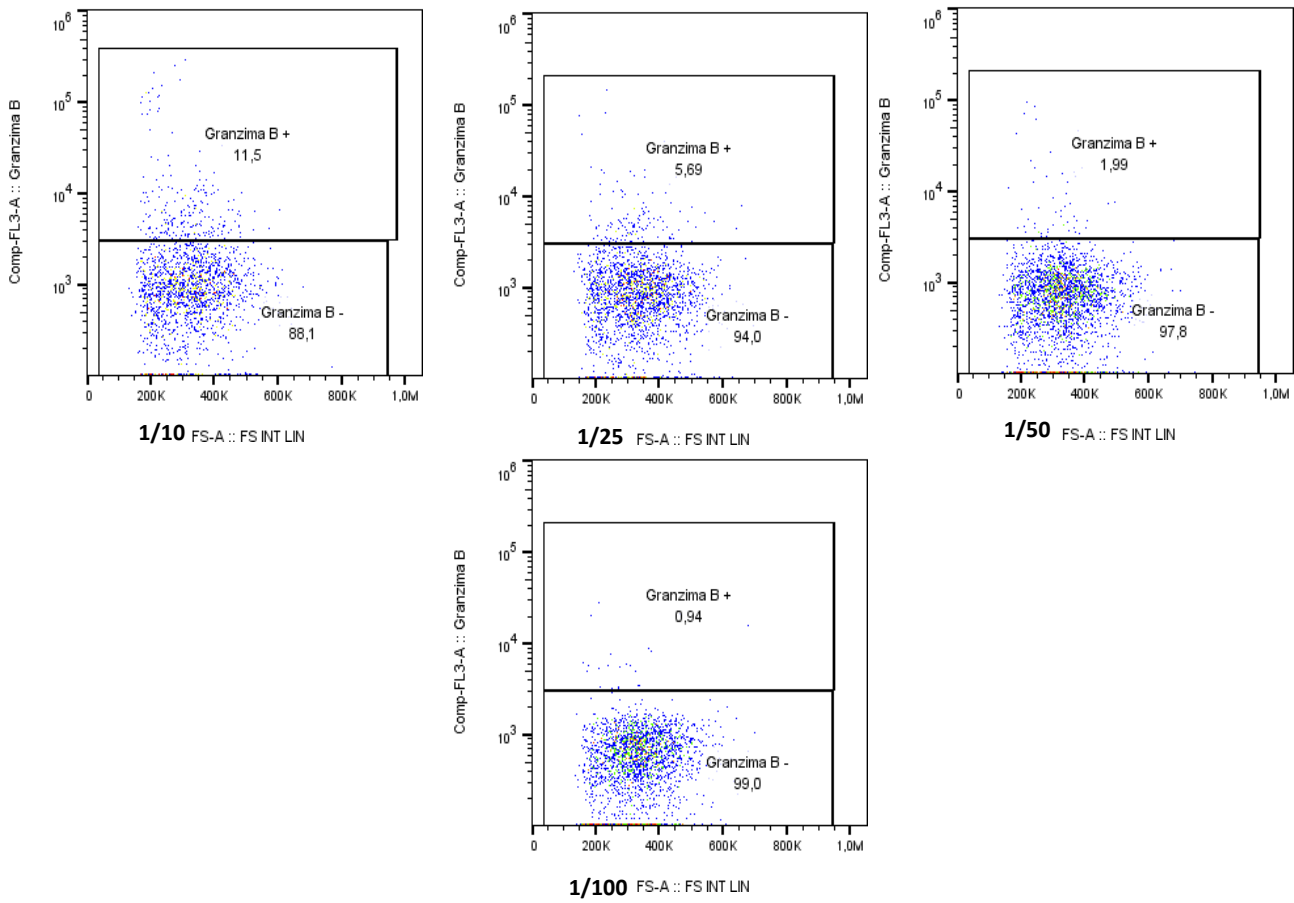


Figura Suplementaria 2.1: titulaciones granzima B

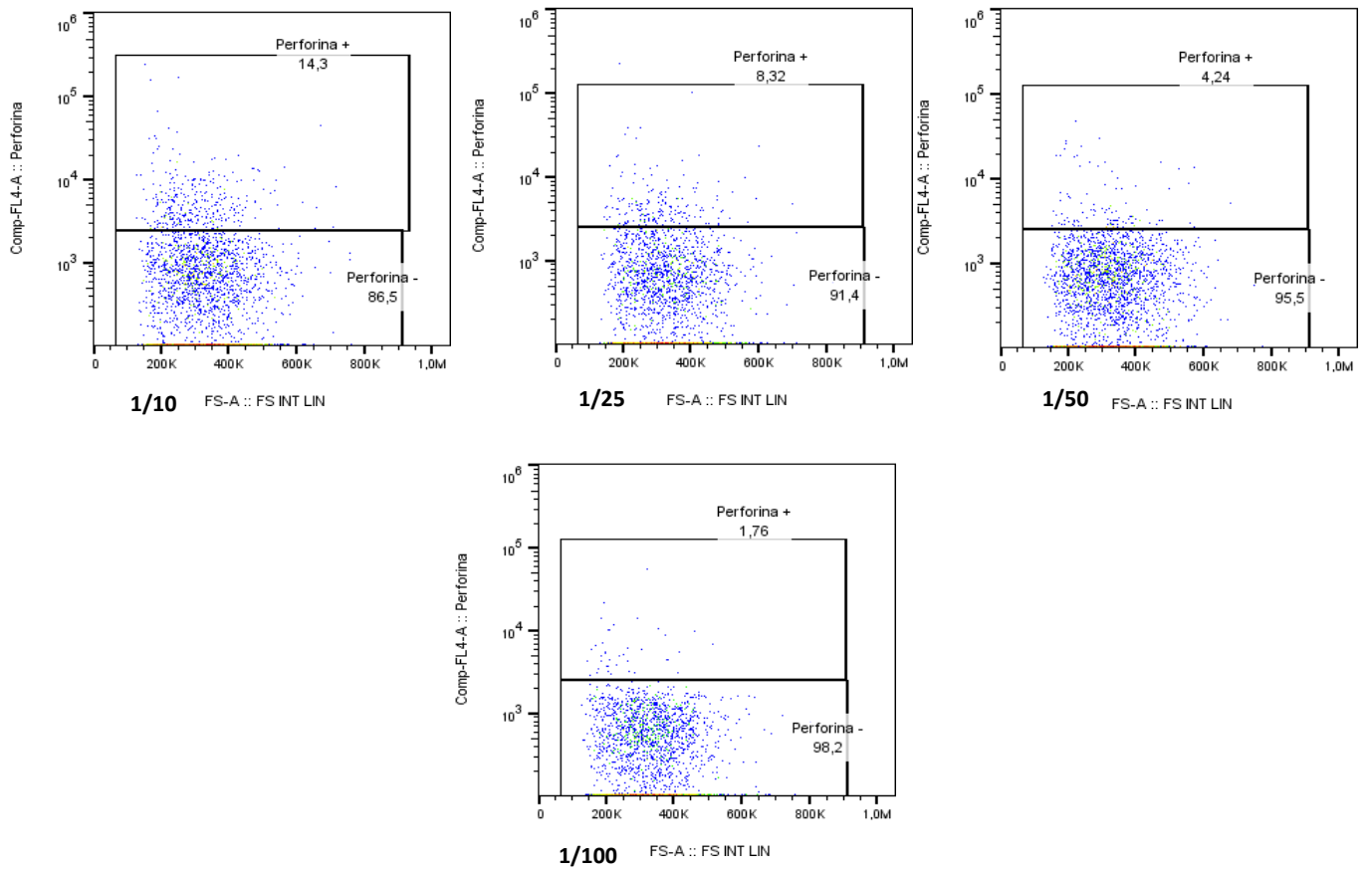
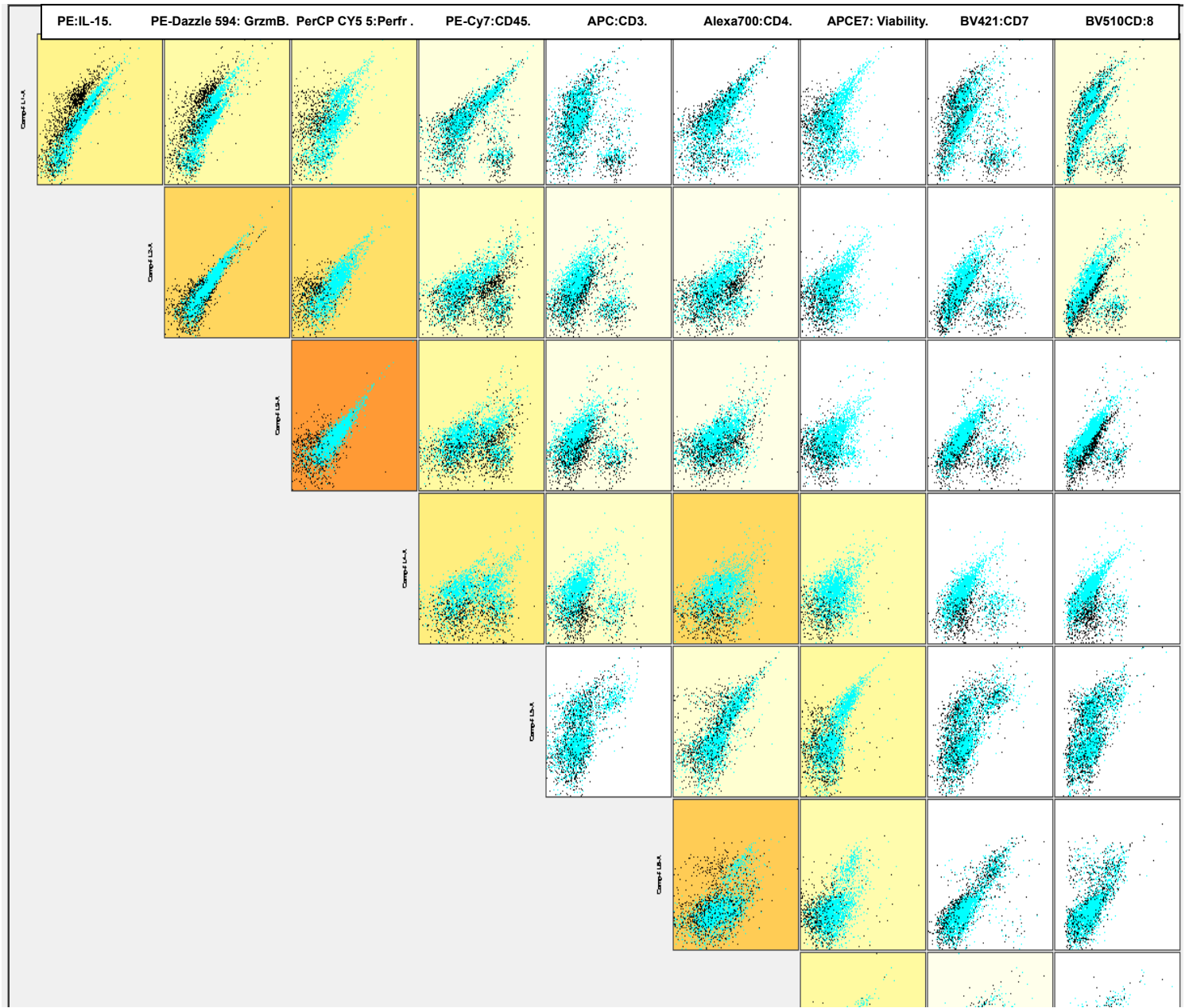


Figura Suplementaria 2.2: Titulaciones perforina.

Figura Suplementaria 3: Matriz de compensación



Show All

	FL1-A :: Tgd FITC	FL2-A :: IL15 PE	FL3-A :: GRAN...	FL4-A :: PERFO...	FL5-A :: CD45 P...	FL6-A :: CD3 A...	FL7-A :: CD4 AL...	FL8-A :: VIABIL...	FL9-A :: CD7 B...	FL10-A :: CD8 B...
FL1-A :: Tgd FITC	100	18,4	8,2	6,5	0,5	0	0	0	0	0,8
FL2-A :: IL15 PE	0,9	100	50,4	41,6	3,1	0,2	0,1	0	0	0,8
FL3-A :: GRANZIMA B PEDazzle 594	0,2	7,2	100	100	9,9	0,3	0,2	0	0	0
FL4-A :: PERFORINA PerCP-CY5.5	0,1	0	0	100	25,9	2,4	48,2	7,1	0	0
FL5-A :: CD45 PECY7	0,1	0,3	0,2	0,2	100	0	1,2	11,1	0	0
FL6-A :: CD3 APC	0,1	0	0	0,9	0,1	100	59,6	6,7	0	0
FL7-A :: CD4 ALEXA 700	0,6	0	0	0	2,1	0	100	10,4	0,1	0
FL8-A :: VIABILITY APC CY7	3,9	2	1,8	3,4	3,1	3,1	21	100	0,7	0,7
FL9-A :: CD7 BV421	0,2	0	0	0	0	0	0,1	0	100	1,7
FL10-A :: CD8 BV510	2	0,2	0	0	0	0	0	0	31,6	100

Agradecimientos.

Expreso mi más sincero agradecimiento a mi tutor de TFG, David Bernardo Ordiz, investigador en el Instituto de Biomedicina y Genética Molecular (IBMG) y profesor de la Universidad de Valladolid. Gracias a su generosidad y confianza, tuve la oportunidad de llevar a cabo un trabajo experimental, lo cual era de suma importancia para mí, dado que la investigación es mi gran pasión. A lo largo de todo el proyecto, he contado con su apoyo incondicional, incluso en los momentos en los que los experimentos no arrojaban los resultados esperados. Sus palabras de aliento siempre fueron reconfortantes: "Tranquila, vas a hacer un buen trabajo". David, gracias por considerarme parte del laboratorio.

Y, por supuesto, no puedo pasar por alto mencionar a Aida Fiz. Sin duda, Aida, este trabajo no hubiera sido posible sin ti. Agradezco sinceramente tu guía, enseñanzas y apoyo, incluso a distancia, hasta el último momento. Para los estudiantes de medicina, este tipo de trabajo resulta complicado debido a nuestras exigentes agendas de sexto curso. No obstante, has tenido la paciencia necesaria para adaptarte a mis horarios y brindarme tu ayuda.

Tampoco puedo dejar de agradecer a Ángel De Prado. Gracias, Ángel, por ser un gran apoyo cuando Aida no estaba disponible.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a Sara, Elisa, Juan, Candi, Paloma y Carol. Como equipo, han sido increíbles y han logrado que mi pasión por la investigación crezca aún más.

ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LOS LINFOCITOS INTRAEPITELIALES EN EL DUODENO HUMANO

Trabajo de Fin de Grado de Medicina. Curso 2022-2023
Autora: Mariama Cire Bah Bah. Tutores: David Bernardo Ordiz, Luis Fernández Salazar

INTRODUCCIÓN

Los linfocitos intraepiteliales (LIE), se encuentran entre las células epiteliales, son la primera línea de defensa del sistema inmune en la mucosa intestinal. Por tanto, una mayor comprensión de su perfil inmunológico en la enfermedad celiaca (EC) puede ser de gran interés para comprender todos los mecanismos inmunes que se desencadenan en la EC.

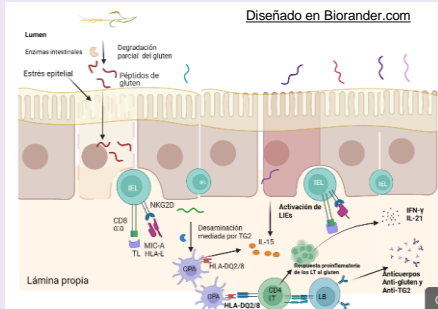


Fig1. RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE AL GLUTEN

OBJETIVO

Desarrollar un panel de citometría que permita estudiar la actividad citotóxica de los LIE del duodeno humano medida por la expresión de IL-15, perforina y granzima B.

MATERIAL Y MÉTODOS

POBLACIÓN DE ESTUDIO

- Biopsias duodenales de pacientes con EC
- Muestras de sangre periférica de donantes.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

- Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP).
- Aislamiento de LIE.
- Cultivo celular.
- Tinción extracelular.
- Tinción intracelular.

ANÁLISIS DE DATOS

La adquisición de las tinciones se realizó en el citómetro de flujo Beckman Coulter Gallios, cuyos resultados fueron analizados mediante el software FlowJo versión 10.8.1.

RESULTADOS 1

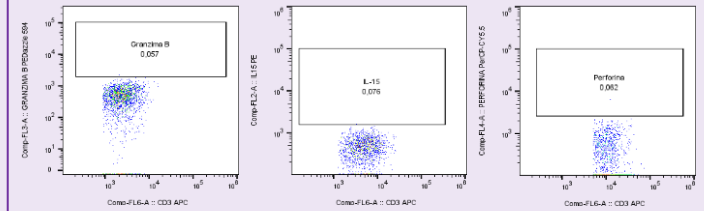


Fig2: CONTROLES FMOS PARA LOS MARCADORES DE IL-15, PERFORINA y GRANZIMA B

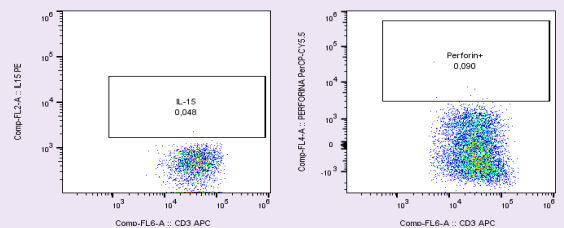


Fig3: TINCIÓN DE MARCADORES INTRACELULARES (GRANZIMA B Y PERFORINA) CON MONENSINA

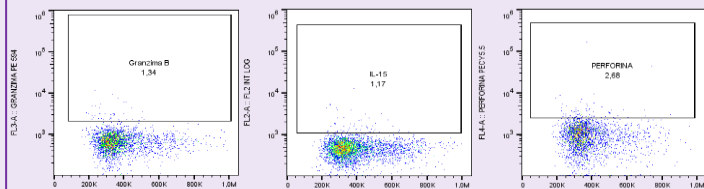


Fig4: TITULACIONES DILUCIÓN 1:50: GRANZIMA B; IL-15; PERFORINA

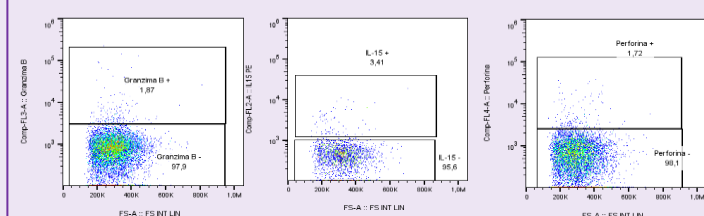


Fig5. TITULACIÓN CON ESTIMULACIÓN LPS 100 NG/ML. DILUCIÓN 1:50. PERFORINA. GRANZIMA B. IL15

RESULTADOS 2

En la optimización del panel se han ajustado los límites de positividad para IL-15, perforina y granzima B (Figuras 2 y 3). Además, se determinó que las diluciones 1/50 son las más adecuadas para la detección de estos marcadores (Figuras 4 y 5). Sin embargo, resulta relevante destacar que no se han identificado poblaciones de LIE que expresen IL-15, granzima B y perforina usando citometría de flujo, tanto en condiciones basales como en presencia de estimulación.

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en este estudio, se descarta la tinción extracelular de IL-15 y la tinción intracelular de granzima B y perforina mediante citometría de flujo en los LIE como modelo para el estudio de la citotoxicidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rojas Vargas C. Celiac disease: an autoimmune disease. Revista Médica Sinergia Vol.6, Núm. 4, abril 2021.- ISSN:2215-4523 / e-ISSN:2215-5279. Disponible en: <http://revistamedicasinergia.com>
2. Bernardo D, Garrote JA, Allegretti Y, León A, Gómez E, Bermejo-Martin JF, et al. Higher constitutive IL15R α expression and lower IL-15 response threshold in celiac disease patients. Clin Exp Immunol [Internet]. 2008 oct;154(1):64-73. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18821940>
3. Rodrigo L, Garrote JA, Vivas S. Enfermedad celiaca. Med Clin (Barc) [Internet]. 2008 Sep;131(7):264-70. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002575308722474>