



---

**Universidad de Valladolid**

Facultad de Ciencias

## **TRABAJO FIN DE GRADO**

Grado en Química

**“Efecto de la criopreservación de biopsias intestinales sobre las subpoblaciones de linfocitos intraepiteliales mediante análisis por citometría de flujo”**

*Autor: Carlota Rivera Bengoa*

*Tutor/es: David Bernardo Ordiz*

*Lucía Citores González*





---

## Universidad de Valladolid

**Departamento de  
Bioquímica y Biología Molecular  
y Fisiología**

LUCÍA CITORES GONZÁLEZ, PROFESORA TITULAR DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y FISIOLÓGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

CERTIFICA: Que el trabajo titulado “Efecto de la criopreservación de biopsias intestinales sobre las subpoblaciones de linfocitos intraepiteliales mediante citometría de flujo”, ha sido realizado por Carlota Rivera Bengoa bajo la tutela del Dr. David Bernardo Ordiz y la mía, y cuenta con mi aprobación para su presentación como Trabajo Fin de Grado.

En Valladolid, a 13 de febrero del 2020.

Fdo.:

Lucía Citores González

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Biología y Genética Molecular de Valladolid durante los últimos meses del 2019.

Expreso mi agradecimiento a mi director de TFG, el Dr. David Bernardo, por guiarme en este proyecto y enseñarme el precioso mundo de la inmunología.

Asimismo, agradezco al director del Instituto (IBGM), el Dr. Carlos Villalobos, por brindarme la posibilidad de realizar el trabajo en el centro; al equipo de Gastroenterología del Hospital Universitario Clínico de Valladolid, encabezado por el Dr. Luis Fernández Salazar, por proporcionarme las muestras; y, por último, a mis compañeras Elisa y Aida por aconsejarme y animarme siempre que lo he necesitado.



## ÍNDICE

RESUMEN .....	9
ABSTRACT.....	10
ABREVIATURAS .....	11
1. INTRODUCCIÓN .....	13
1.1. DIAGNÓSTICO.....	13
1.1.1. Pruebas de diagnóstico .....	13
2. FUNDAMENTO TEÓRICO .....	17
2.1. CLÚSTERES DE DIFERENCIACIÓN .....	17
2.2. ANTICUERPOS MARCADOS POR FLUOROCROMOS.....	19
2.3. FENÓMENO DE FLUORESCENCIA.....	19
2.4. CITOMETRÍA DE FLUJO .....	19
2.4.1. Fenomenología de la citometría de flujo.....	19
2.4.2. Funcionamiento del citómetro.....	20
3. OBJETIVOS .....	22
4. MATERIAL Y MÉTODOS .....	24
4.1. MUESTREO .....	24
4.2. REACTIVOS .....	24
4.3. DISOLUCIONES TAMPÓN .....	25
4.4. ANTICUERPOS/MATERIAL DE CITOMETRÍA .....	26
4.5. EQUIPAMIENTO .....	27
4.6. MATERIAL.....	27
4.7. PROTOCOLOS DE TRABAJO.....	28
4.8. CRIOPRESERVACIÓN .....	30
4.9. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO .....	30
5. RESULTADOS.....	33
5.1. IDENTIFICACIÓN DE POBLACIONES LINFOCITARIAS .....	33
5.1.1. Identificación de linfocitos intraepiteliales .....	33

5.1.2.	Controles para la identificación de poblaciones .....	34
5.1.3.	Variabilidad de los IEL en el duodeno humano .....	37
5.2.	CONGELACIÓN DE LAS BIOPSIAS .....	42
5.2.1.	Identificación de los IEL .....	42
5.2.2.	Comparativa frescas vs congeladas para cada marcador en cada subpoblación	
	51	
6.	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	57
6.1.	INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS .....	57
6.2.	DIAGNÓSTICO.....	57
6.3.	REPERCUSIÓN SOCIAL Y CIENTÍFICA.....	59
6.4.	PERSPECTIVAS DE FUTURO .....	59
6.5.	CONCLUSIONES .....	60
7.	BIBLIOGRAFÍA .....	62
8.	ANEXOS.....	65





# **Efecto de la criopreservación de biopsias intestinales sobre las subpoblaciones de linfocitos intraepiteliales mediante análisis por citometría de flujo**

## **RESUMEN**

La enfermedad celíaca es un trastorno que cada día afecta a más población siendo su diagnóstico complicado y poco concluyente. El linfograma intraepitelial es una técnica avanzada que demuestra la existencia de esta enfermedad, pero no puede aplicarse en aquellos hospitales que no cuentan con los equipos pertinentes para realizarla, ya que es necesario que se lleve a cabo transcurridas pocas horas tras la extracción de la muestra del paciente. Además, dicha técnica requiere del acceso a un citómetro de flujo que no siempre se encuentra disponible en los hospitales. Por ello, en este trabajo se propone la criopreservación del tejido intestinal como un método de ampliación de esta técnica, para que pueda efectuarse en mayor número de centros y mejorar así el diagnóstico de esta enfermedad y consecuentemente, la calidad de vida de los pacientes.

Palabras clave: Enfermedad celíaca – Linfocitos – Intraepitelial – Citometría de flujo – Intestino – Inflamación

## **ABSTRACT**

Celiac disease is a disorder that is affecting more and more people every day, being its diagnosis complicated and inconclusive. The intraepithelial lymphogram is an advanced technique to prove the existence of this disease, but it cannot be applied in those hospitals that do not have the relevant equipment to perform it, since it must be performed within a few hours after the extraction of the sample from the patient. Furthermore, this technique requires access to a flow cytometer that is not always available in all hospitals. Therefore, this work proposes the cryopreservation of intestinal tissue as a method to extend this technique, so that it can be performed in more centers and thus improve the diagnosis of this disease and consequently, the quality of life of patients.

Key words: Coeliac disease – Lymphocytes – Intraepithelial – Flow cytometry – Bowel – Inflammation

## **ABREVIATURAS**

EC: Enfermedad celíaca

NK: del inglés *Natural Killer*

TCR: del inglés *T Cell Receptor*

IgA: inmunoglobulina A

RNA: ácido ribonucleico

LIE: linfocitos intraepiteliales

CD: cluster de diferenciación

FMO: del inglés *Fluorescence Minus One*



## **1. INTRODUCCIÓN**

La enfermedad celíaca (EC) es uno de los trastornos crónicos y autoinmunes más frecuentes en aquellos países en los que predomina el gluten en la dieta. De hecho, en nuestro país es la intolerancia alimentaria más común<sup>1</sup>. Consiste en una intolerancia a las proteínas de determinados cereales (trigo, cebada, centeno y algunas variedades de avena) que provoca una atrofia severa en la mucosa del duodeno (intestino delgado superior). Como consecuencia, el epitelio de dicha región verá su tamaño disminuido de modo que la absorción de nutrientes será menor, repercutiendo esto en el desarrollo y crecimiento del paciente en cuestión.

### **1.1. DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico de esta enfermedad es complicado, ya que son muchos los análisis necesarios para determinar un resultado concluyente.

El criterio de diagnóstico para la enfermedad celíaca está actualmente basado en encontrar atrofiyas vellositarias e hiperplasia de las criptas en el intestino delgado superior, junto con inflamación extensiva del epitelio y la lámina propia, así como presentar una mejora clínica y/o histológica tras la inducción de una dieta sin gluten<sup>2</sup>.

#### **1.1.1. Pruebas de diagnóstico**

Sin embargo, existen varias intervenciones de diagnóstico que permiten afirmar con mayor precisión la existencia de enfermedad celíaca en el paciente. Las principales pruebas son las siguientes<sup>3</sup>.

- Análisis serológico que evidencie la presencia de anticuerpos IgA

Los principales marcadores presentes en el suero (plasma sanguíneo sin proteínas) que evidencian esta enfermedad son los de tipo antiendomiso (EMA), antigliadinas (AGA) y antitransglutaminasa (AATGt).

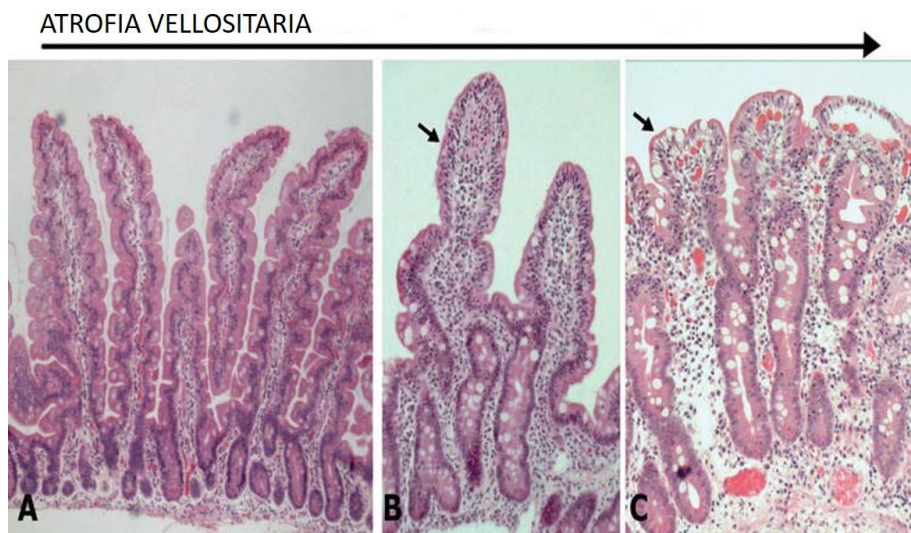
- Prueba de análisis de haplotipo de riesgo

Esta enfermedad requiere predisposición genética para llegar a desarrollarse siendo actualmente dos genes los que señalan una relación directa con la enfermedad.

Esta predisposición genética a la enfermedad celíaca está asociada a la presencia del heterodímero HLA-DQ2. Aproximadamente el 90% de los casos de enfermedad celíaca están asociados a este heterodímero. Del resto de celíacos, aproximadamente el 5% son portadores de un segundo heterodímero HLA-DQ8<sup>4</sup>.

- Atrofia vellositaria

La presencia de una atrofia en el intestino se puede comprobar mediante la extracción de una biopsia que presente atrofia de las vellosidades intestinales, hiperplasia de las criptas y linfocitosis intraepitelial (FIGURA 1). Esto se traduce en un apelmazamiento de los epitelios del intestino, impidiendo así la absorción de los nutrientes.



*FIGURA 1: ATROFIA VELLOSIARIA INTESTINAL. Desarrollo de la lesión de la mucosa del intestino delgado inducida por gluten con el tiempo en la enfermedad celíaca. En la primera imagen (A) se observa una estructura vellosa normal, en la segunda imagen (B) se aprecia inflamación de la mucosa con hiperplasia de la cripta, mientras que en la última (C) se puede diagnosticar atrofia vellosa con hiperplasia de la cripta. Las flechas muestran el sitio de la linfocitosis intraepitelial.*

- Dieta sin gluten

Es el único tratamiento que existe para este tipo de pacientes. Se trata de eliminar la ingesta de gluten para evitar así todos los síntomas que esta intolerancia plantea.

Se utiliza como prueba de diagnóstico ya que no es invasiva ni perjudicial en ningún aspecto para el paciente y permite afirmar la presencia de EC si éste mejora tras su seguimiento.

- Linfograma intraepitelial

Una de las técnicas complementarias utilizadas en el diagnóstico de la EC es el linfograma intraepitelial. Se trata de un análisis poblacional de las células del sistema inmune que presenta el tejido intraepitelial del intestino. Mediante esta técnica, es posible conocer el porcentaje de linfocitos  $T\gamma\delta$ , que son biomarcadores de la enfermedad celíaca. Niveles aumentados de estas células evidencian que el paciente presenta este trastorno<sup>5</sup>.

Esta es la técnica evaluada en este estudio. Para ello, es necesario la extracción de muestras del paciente mediante una endoscopia. Las biopsias obtenidas serán el sujeto de análisis.

Los principales inconvenientes que plantea esta prueba es el equipamiento necesario para su realización, ya que los resultados se procesan con un citómetro de flujo (equipo con el que no cuentan muchos hospitales en España), así como el procesamiento de la muestra que ha de realizarse en los minutos consecutivos a su extracción, es decir, cuando la muestra aún está fresca.

El objetivo principal de este trabajo es solventar la indisponibilidad para realizar esta prueba de diagnóstico proponiendo como solución la criopreservación de las muestras, pudiendo así extenderla a más hospitales. Para demostrarlo, se realizará un estudio comparativo de las poblaciones de linfocitos de muestras frescas frente a muestras congeladas. En este contexto, estudios recientes han demostrado que las biopsias intestinales no presentan diferencias de viabilidad y funcionalidad en las células inmunes tras su criopreservación<sup>6</sup>. Sin embargo, si bien los abordajes de criopreservación de biopsias intestinales han demostrado que no existen diferencias para el estudio de las células de la lámina propia mediante abordajes de citometría de masas o secuenciación masiva de RNA, o incluso para el cultivo de organoides, no se ha estudiado si esta técnica puede aplicarse para el estudio de las poblaciones intraepiteliales.





## **2. FUNDAMENTO TEÓRICO**

### **2.1. CLÚSTERES DE DIFERENCIACIÓN**

En primer lugar, es preciso conocer que todas las células del sistema inmune presentan una proteína denominada clúster de diferenciación CD45. Este es el primer eslabón de la cadena de poblaciones hasta llegar a los linfocitos que determinarán la posibilidad de existencia de EC.

Existen tres tipos de linfocitos; los linfocitos B (que expresan CD19), los linfocitos T (objetivo del estudio y marcados por CD3) y linfocitos NK (los más desconocidos hasta ahora ya que son la población excluida por dichos marcadores, es decir, CD19- y CD3-). Sin embargo, hay un clúster común a los linfocitos T y los NK, CD7. Por lo tanto, la nomenclatura en marcadores para cada tipo de linfocito será la siguiente<sup>7</sup>:

- Linfocitos B: CD19+
- Linfocitos T: CD7+ CD3+
- Linfocitos NK: CD19- CD3- CD7+

Los linfocitos T, que son aquellos de interés en este estudio, presentan una región de naturaleza proteica denominada TCR (receptor de células T) que es lo que les confiere la capacidad de reconocer antígenos<sup>8</sup>.

Existen dos tipos de células T (o linfocitos T) en base a su receptor de células T (TCR), o T-cell receptor en inglés: alfa beta ( $\alpha\beta$ ) o gamma delta ( $\gamma\delta$ ). Los linfocitos  $T\alpha\beta$  están presentes únicamente en mamíferos superiores mientras que los linfocitos  $T\gamma\delta$  están presentes en todas las especies que tienen un sistema inmune adaptativo.

Dentro de la población de  $T\alpha\beta$ , van a aparecer otros dos tipos de linfocitos: los helpers o ayudantes, (identificados por la expresión de CD4) y los citotóxicos (identificados por la expresión de CD8). Estos últimos, al reconocer al antígeno se encargan de inducir su lisis, mientras que los helpers, tras el reconocimiento, producen citocinas que desencadenarán una respuesta del sistema inmune.

Las poblaciones de las que se va a hablar posteriormente son la población de linfocitos intraepiteliales (LIE)  $T\gamma\delta$ , la población de LIE CD3 clásicos y la población de NK like. Estas tres se analizarán de forma individualizada, tanto su porcentaje como su fenotipo en muestras frescas y congeladas.

Para identificarlas se muestra a continuación (FIGURA 2) una clasificación leucocitaria para los linfocitos intraepiteliales. Como bien se conoce, el marcador CD45 es específico para los leucocitos. Dentro de la población que lo expresa, se pueden apreciar otras dos poblaciones: los CD3 positivos y los CD3 negativos. Dentro de los primeros es dónde se encuentran dos de las subpoblaciones de interés: los T $\gamma\delta$ , que expresan tanto CD3 como T $\gamma\delta$ , y los CD3 clásicos que solamente expresan CD3. Volviendo atrás, se encuentra la población que no expresa CD3, donde se encuentran los NK like<sup>9</sup>. Esta es una población de linfocitos de la que se sabe aún muy poco, pero es determinante en el diagnóstico de EC ya que se conoce que un porcentaje de NK like inferior al 20% determina inflamación intestinal<sup>10</sup>.

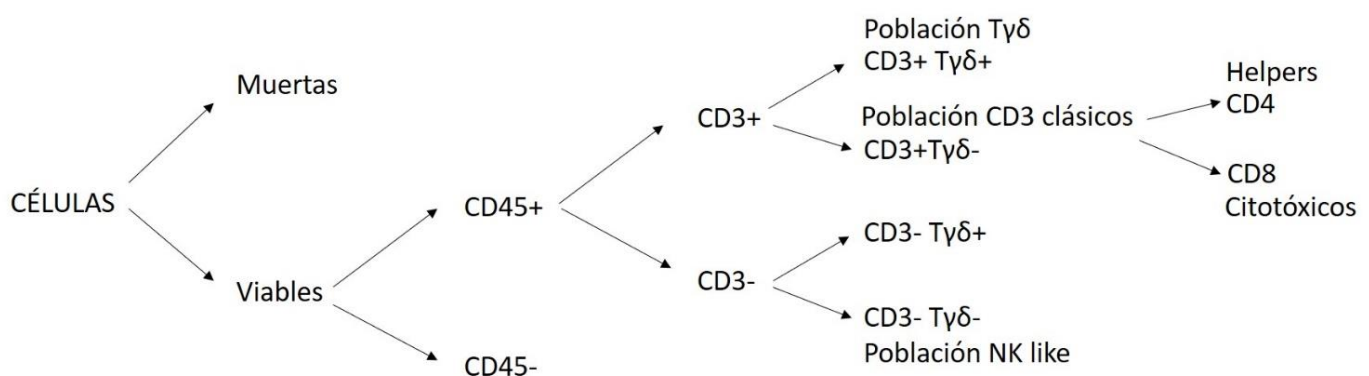


FIGURA 2: GATING CELULAR. Poblaciones de linfocitos intraepiteliales.

Asimismo, para el diagnóstico de EC, se ha sugerido que un recuento bajo de linfocitos NK-like, está asociado a la presencia de inflamación en el intestino. Por lo tanto, estas dos son las poblaciones más determinantes a la hora de dar un diagnóstico. De esta forma, todos los pacientes no celíacos presentarán niveles disminuidos de linfocitos T $\gamma\delta$  y niveles bajos de linfocitos NK-like si la mucosa está inflamada o normales si no lo está. Por el contrario, todos los pacientes con enfermedad celíaca presentan niveles aumentados en los linfocitos T $\gamma\delta$ . A su vez, los niveles bajos de NK-like indicarán si el paciente presenta inflamación (paciente de nuevo diagnóstico), o si por el contrario se trata de un paciente celíaco sin inflamación intestinal (niveles normales de la población NK-like) consecuencia de seguir de forma correcta la dieta sin gluten.

## **2.2. ANTICUERPOS MARCADOS POR FLUOROCROMOS**

Como se ha mencionado previamente, cada tipo de célula presenta proteínas únicas que permiten su identificación frente a otras células, pero ¿cómo se puede observar esto a nivel macromolecular?

La técnica de citometría de flujo plantea el uso de anticuerpos específicos frente a dichas proteínas que expresan las células, estando además estos anticuerpos conjugados con diversos fluorocromos que emiten a una longitud de onda diferente. De esta forma, al evaluar las longitudes de onda emitidas por una célula se puede determinar los anticuerpos que se le han unido y por tanto las proteínas que expresa dicha célula<sup>11</sup>.

## **2.3. FENÓMENO DE FLUORESCENCIA**

Los fluorocromos son sustancias capaces de absorber energía en forma de radiaciones electromagnéticas y luego emitir parte de esa energía en forma de radiación electromagnética de longitud de onda superior (ANEXO). En el estudio se han utilizado fluorocromos que absorben radiación a tres longitudes de onda: 405nm, 488nm, 633nm, ya que son las longitudes a las que emiten los tres láseres con los que cuenta el citómetro del que se dispone para el estudio.

## **2.4. CITOMETRÍA DE FLUJO**

La citometría de flujo es una técnica cuantitativa utilizada para medir simultáneamente ciertas características fisicoquímicas de células o partículas en suspensión que atraviesan un haz de luz (láser) y ofrece la posibilidad de separarlas en función de sus particularidades (sorting)<sup>12</sup>.

### **2.4.1. Fenomenología de la citometría de flujo**

En la citometría de flujo están presentes cuatro fenómenos fisicoquímicos: la fluídica debido al flujo laminar que se genera con la entrada de células; la óptica, debido a la utilización de láseres, la presencia de luz dispersada y fluorescencia y el sistema de filtros para la recolección de señal; la electrónica debido a la amplificación de la señal mediante detectores

fotomultiplicadores; y la informática ya que es necesario un software para realizar el análisis de datos.

#### **2.4.2. Funcionamiento del citómetro**

El procedimiento de funcionamiento del citómetro es el siguiente:

La suspensión de células se coloca dentro del citómetro el cual la aspira mediante un sistema de vacío. Una vez dentro del sistema, se mezcla con una solución salina de forma que la suspensión celular pasará a través de un canal estrecho, provocando así que las células formen una sola línea antes de que pasen a través del haz de luz.

Cada célula dentro de la muestra atraviesa el rayo láser una por una, permitiendo así que cada una de ellas sea analizada de forma individual. De este modo, cada vez que una célula atraviese el haz, el láser dispersará la luz en múltiples direcciones. La denominada *forward scatter* es la sombra generada en sentido frontal y es quien dará la relación directa con el tamaño de la célula. Por otro lado, la luz *side scatter* es dispersada lateralmente y está relacionada con la complejidad interna de la célula. El citómetro detecta la luz dispersada gracias a unos sensores que convierten la luz dispersada en un pulso eléctrico, que es directamente proporcional a la cantidad de luz dispersada.

Analizando los dos tipos de luz dispersada se puede obtener un análisis del tamaño, y complejidad de la célula. Esto permite dividir las células de la muestra en diferentes poblaciones según sus características.

Además de este tipo de análisis, la técnica de citometría de flujo también permite detectar luz emitida por moléculas excitadas por fluorescencia como por ejemplo anticuerpos marcados con fluorocromos, que es el caso de este estudio.

Los fluorocromos son excitados por longitudes de onda específicas para cada uno de ellos. Por eso, el citómetro cuenta con diferentes láseres. Tras la excitación, la luz emitida por el fluorocromo es dirigida a lo largo de un camino de espejos que van “rompiendo” el haz de luz en función de la longitud de onda. La luz dispersada que sale de ellos llega a una serie de filtros que permiten la detección de múltiples fluorocromos (FIGURA 3).

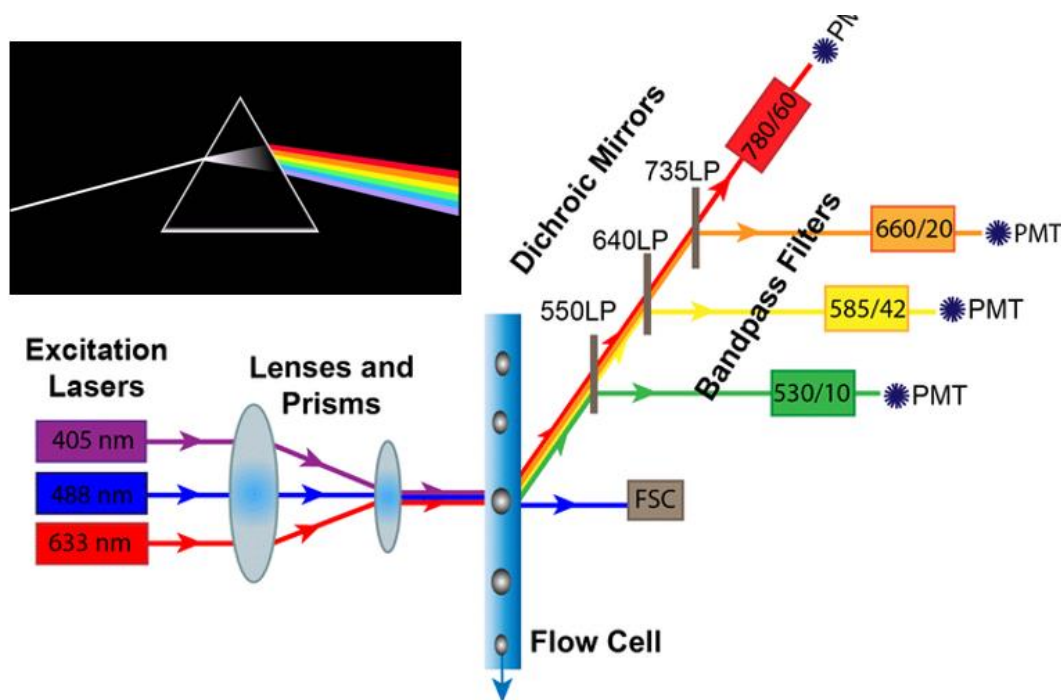


FIGURA 3: FUNCIONAMIENTO DEL CITÓMETRO. *Dispersión de la luz dentro del citómetro.*

En el citómetro referenciado en la FIGURA 3, se puede observar cómo la fluorescencia emitida por las células se conduce a través de tres espejos dicróicos, de forma que el proceso sería del siguiente modo;

Hay tres filtros de longitud de onda: el primero, dejará pasar toda la energía con longitud de onda mayor de 550nm, el segundo a toda aquella mayor de 640nm y el tercero únicamente a la energía con longitud de onda mayor que 735nm.

Estas ramas de energía reflejadas por cada espejo posteriormente atraviesan unos filtros que captan solamente las energías con  $\lambda$  pertenecientes a un rango. El primer filtro detectará la luz dispersada por aquellos fluorocromos que emitan entre 525nm y 535nm, el segundo detecta los fluorocromos que emiten entre 564nm y 606nm, el tercero entre 650nm y 670nm y el cuarto entre 750nm y 810nm. Esta energía a su vez será captada por sensores fotomultiplicadores que la convierten en señal eléctrica.

La señal eléctrica será posteriormente analizada por un equipo informático que extraerá los datos en formato digital.

### **3. OBJETIVOS**

Los objetivos de este estudio son los siguientes:

- Identificar linfocitos intraepiteliales en el duodeno humano y caracterizar su fenotipo.
- Evaluar si la criopreservación de las biopsias previa a su análisis afecta a su identificación y/o fenotipo.



## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.1. MUESTREO**

Para extraer las muestras celulares del intestino, se intervino a los pacientes mediante una técnica denominada endoscopia que consiste en la introducción de un equipo quirúrgico que consta de una cámara y unas pinzas de extracción de biopsias. Se introduce a través de la cavidad bucal del paciente y se extiende hasta el comienzo del duodeno, donde se toman las biopsias en el contexto de la práctica clínica habitual.

Tras la extracción de las muestras se preservaron por el equipo clínico en medio de cultivo celular (RPMI 1640) durante un periodo máximo de 30min y a 4°C hasta su recolección y posterior llegada al laboratorio anexo al hospital.

La toma de muestras se realizó a 13 pacientes (8 mujeres y 5 hombres) en el Departamento de Gastroenterología del Hospital Clínico Universitario de Valladolid, dirigido por el Dr. Luis Fernández Salazar. La edad media de los pacientes fue de 44 años en el momento de la toma de muestras. La edad media de las 8 mujeres fue de 47 y la de los 5 hombres de 40.

La toma de estas muestras fue consentida de forma escrita por cada uno de los pacientes intervenidos en el contexto del proyecto con código PI19/1352 aprobado por el Comité Ético de Investigación con medicamentos (CEIm) del Área de Salud de Valladolid Este a fecha de 25 de abril de 2019.

### **4.2. REACTIVOS**

Los reactivos utilizados fueron los siguientes:

- **Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)**  
Marca: Gibco  
Concentración: 1X
- **Medio completo de cultivo Roswell Park Memorial Insitute (RPMI 1640 Medium)**  
Marca: Gibco  
Concentración: 1X



- **Ditiotreitol (DTT)**  
 Marca: Sigma-Aldrich  
 Concentración de las alícuotas preparadas: 100mM  
 Preparación de las alícuotas: 1g DTT + 65ml H<sub>2</sub>O milliQ. Esterilizar por filtración y preparar alícuotas de 500µl en cada vial para conservar en el congelador a -20°C.
- **Ácido etilendiaminotetraacético disódico (EDTA)**  
 Marca: Sigma-Aldrich  
 Concentración de la disolución preparada: 50mM  
 Preparación de la disolución: 1.86g Na<sub>2</sub>EDTA + 100ml H<sub>2</sub>O milliQ. Esterilizar por filtración y conservar en la nevera a 4°C.
- **Paraformaldehído (PA)**  
 Marca: Protocol  
 Concentración de la disolución preparada: 2%  
 Preparación de la disolución: dilución de PA al 10% en FACS Buffer.
- **Suero fetal bovino o *Fetal Calf Serum* (FCS)**  
 Marca: Gibco  
 Alícuotas de 10ml preparadas en esterilidad.
- **Azida sódica (NaN<sub>3</sub>)**  
 Marca: Sigma
- **Reactivo fijador (Reactivo A)**  
 Marca: BioRad
- **Reactivo permeabilizador (Reactivo B)**  
 Marca: BioRad

#### 4.3. DISOLUCIONES TAMPÓN

Las disoluciones tampón se prepararon a partir de los reactivos anteriores.

- **Disolución tampón salina o *Phosphate Buffered Saline* (PBS)**  
 Marca: Sigma-Aldrich

- **Disolución de citometría o *Fluorescence Activated Cells Sorting Buffer* (FACS Buffer)**

Preparación: Añadir 10ml suero fetal bovino + 0.1g  $\text{NaN}_3$  (azida de sodio) + 0.18g EDTA a un volumen total de 500ml de PBS.

- **Disolución para separar el epitelio (HBSS suplementado con DTT y EDTA)**

Preparación de disolución: Añadir 1ml EDTA + 500 $\mu$ l DTT a 49ml de HBSS.

- **Medio de congelación**

90% suero fetal bovino y 10% DMSO (dimetilsulfóxido).

#### 4.4. ANTICUERPOS/MATERIAL DE CITOMETRÍA

Se hicieron cuatro tinciones diferentes.

- **Tinción de viabilidad de las células (*Viability dye*)**

Marca: ThermoFisher Scientific (Invitrogen)

Canal equivalente a APC-Cy7

LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit, for 633 or 635 nm excitation

- **Tinción bloqueante de receptores Fc**

Marca: BD

- **Tinción de citometría**

ANTICUERPO	FLUOROCROMO	CLON
TCR $\gamma\delta$	FITC	B1
CD16	PE	3G8
CD127	PE-CF594	HIL-7R-M21
CD45	PE-Cy7	HI30
CD3	APC	HIT3a
CD8	Alexa Fluor	RPA-T8
CD7	BV421	M-T701
CD4	BV510	SK3
CD56	PE	B159

- **Tinción intracelular**

Anticuerpo CD3 conjugado al fluorocromo PE-Cy5 (Clon: UCHT1).

#### **4.5. EQUIPAMIENTO**

El material utilizado en todos los experimentos fue el siguiente.

- **Agitador tipo Vortex**  
Marca: Heidolph Reax Top
- **Microcentrífuga "Centrifuge 5424R"**  
Marca: Eppendorf
- **Centrífuga "Rotanta 460R"**  
Marca: Hettich Zentrifugen
- **Agitador tipo Shaker "MaxQ 4000"**  
Marca: Barnstead Lab-Line

#### **4.6. MATERIAL**

Los instrumentos y herramientas de laboratorio utilizados fueron los siguientes.

- **Micropipetas**  
Marca: Eppendorf Research Plus
- **Tubos**  
Marca: BD Falcon (15ml) y Corning (50ml)
- **Placas**  
Marca: Falcon (Corning Brand)

- **Filtros 100µm de Nylon**

Marca: Fisherbrand

- **Tubos de citometría**

Marca: Falcon (Corning Brand)

- **Pipetas Pasteur**

Marca: Falcon (Corning Brand)

#### **4.7. PROTOCOLOS DE TRABAJO**

De cada paciente, se obtuvo un número par ( $n$ ) de biopsias. Esto permitió que  $n/2$  biopsias se procesaran en fresco y  $n/2$  se congelaron para poder realizar así el estudio comparativo en cuestión.

El procedimiento que se utilizó para aislar la población de los linfocitos intraepiteliales procedentes de biopsias frescas es el siguiente<sup>13</sup>:

Se depositó la muestra sobre una placa Petri con ayuda de una pipeta Pasteur para que todas las biopsias quedasen depositadas. Dichas biopsias se tomaron con la misma pipeta, se llevaron a un tubo Falcon de 15ml y se le añadieron 5ml de disolución de HBSS suplementado con DTT y EDTA. Se agitó el tubo con la ayuda un agitador tipo Vortex y a continuación, se introdujo en un agitador orbital durante 30 minutos, a 37°C y 250 (rpm).

Después de la primera incubación de la muestra, se traspasó el contenido del tubo (células resuspendidas en HBSS) a la placa Petri. Las biopsias que quedaron en el tubo se siguieron resuspendiendo, para lo que se añadió de nuevo 5ml de HBSS con DTT+EDTA al mismo tubo, se llevaron de nuevo al agitador orbital y se incubaron con las mismas condiciones que antes.

El remanente de la placa Petri se recogió en un nuevo tubo Falcon de 15ml para mantener a 4°C.

Tras la segunda incubación de la muestra, se transfirió el contenido del tubo a la placa Petri y se lavó con otros 5ml de HBSS suplementado con DTT y EDTA, que también se depositaron sobre la placa. Todo ello se recogió en el tubo mantenido a 4°C, de modo que éste finalmente contenía 15ml de disolución.

El objetivo de estas incubaciones fue eliminar la capa mucosa externa y separar el epitelio de la lámina propia. El papel que desempeñó el DTT en esta incubación fue de tensioactivo, es decir, se encargó de generar micelas alrededor de las moléculas de naturaleza lipídica presentes en el moco intestinal para facilitar su eliminación. El EDTA, sin embargo, se añadió para complejar el  $\text{Ca}^{2+}$  que ancla el epitelio sobre la lámina propia y permitir así la separación de ambas capas.

El contenido del tubo de 15ml se filtró (100 micras) sobre otro para eliminar los restos de mucosa y fibras de colágeno remanentes en la disolución. El tubo se centrifugó durante 10 minutos, a 4°C y 400 unidades de fuerza centrífuga relativa (RCF: *relative centrifugal force* o fuerza g) con una bajada de freno 3.

Transcurridos esos minutos, se descartó el sobrenadante y se secó el tubo con cuidado de no resuspender el pellet celular, enriquecido en células epiteliales y linfocitos intraepiteliales. Se agitó el tubo con el agitador Vortex para resuspender el pellet y se le añadió 1ml de FACS Buffer. Se traspasó el contenido a un tubo de citometría con la ayuda de la misma pipeta.

Para teñir las células muertas se utilizó un marcador de viabilidad (viability dye). Se añadieron 0.5µl de dicho marcador al tubo y incubó durante 30 segundos a temperatura ambiente (T<sup>a</sup>).

Se centrifugaron las células de nuevo a 400 RFC y 4°C con bajada de freno normal (9) durante 5 minutos. Después de ese tiempo, se repitió mismo proceso de descartar el sobrenadante y se secó el tubo con cuidado de no resuspender el pellet. Se añadieron 100 µl de FACS Buffer al tubo. Las uniones inespecíficas de los anticuerpos a las células se bloquearon añadiendo 2µl de FC block y se dejó incubar la muestra en la oscuridad durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Después, para lavar, se añadió 1 ml de FACS buffer al tubo y se centrifugó con las mismas condiciones (400 RFC y 4°C con bajada de freno normal (9) durante 5 minutos). A continuación, se descartó el sobrenadante y se secó el tubo con cuidado de no resuspender el pellet. Una vez eliminado el sobrenadante, se agitó el tubo con el agitador Vortex para resuspender el pellet.

Para teñir las células, se añadieron al tubo 100µl de una disolución que contenía los anticuerpos marcados con los fluorocromos correspondientes. La concentración óptima de cada anticuerpo había sido optimizada en el Laboratorio de Inmunología de las Mucosas del Instituto de Biología y Genética Molecular. Se dejó incubar el tubo en oscuridad a 4°C durante 20 minutos.

Se lavó de nuevo del mismo modo que anteriormente.

Para realizar la tinción intracelular, se añadieron al tubo 100µl de reactivo A (fijador de tinción extracelular) y se dejó incubar durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Se lavó pasada esta media hora y se resuspendió en 100µl de reactivo B (formador de poros en la membrana celular). Se añadió 1µl del anticuerpo intracelular CD3 marcado con PE-Cy5 (que penetró a través de los poros generados por el reactivo B) y se dejó incubar en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Se lavó de nuevo del mismo modo que anteriormente.

Para fijar las células, se añadieron 250µl de Paraformaldehído al 2% y se dejó reposando durante 10 minutos en la oscuridad a 4°C.

Se lavó de nuevo del mismo modo que anteriormente.

Finalmente, se añadieron al tubo 500µl de FACS Buffer y se conservó a 4°C hasta su adquisición en el citómetro.

#### **4.8. CRIOPRESERVACIÓN**

Se prepararon las biopsias para criopreservar. Para ello, se añadió 1ml de medio de congelación a un criovial y se depositaron en él las biopsias escogidas para congelar. Las biopsias fueron inmediatamente transferidas a contenedores específicos de congelación (disminuyen la temperatura a 1°C por minuto) a un congelador a -80°C. Al día siguiente, las biopsias fueron archivadas en el congelador. Una semana después de su congelación, el criovial con las biopsias fue descongelado en medio de cultivo y las biopsias procesadas de la misma manera que anteriormente para obtener y teñir la población de linfocitos intraepiteliales.

#### **4.9. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO**

En todos los casos se compararon los datos obtenidos de un mismo individuo por lo que los datos se consideraron pareados.

Los tests estadísticos fueron realizados con el software GraphPad Prism 7. Se empleó la prueba d'Angostino y Pearson para determinar si las diferencias entre los distintos grupos seguían una curva de normalidad.

Puesto que las diferencias eran paramétricas las comparaciones se realizaron mediante la prueba ANOVA y una t de student para muestras pareadas. Los datos se trataron como la media +/- el error estándar de la media (S.E.M).

En todos los casos se consideró como significativo p-valores menores a 0,05 (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).





## 5. RESULTADOS

### 5.1. IDENTIFICACIÓN DE POBLACIONES LINFOCITARIAS

#### 5.1.1. Identificación de linfocitos intraepiteliales

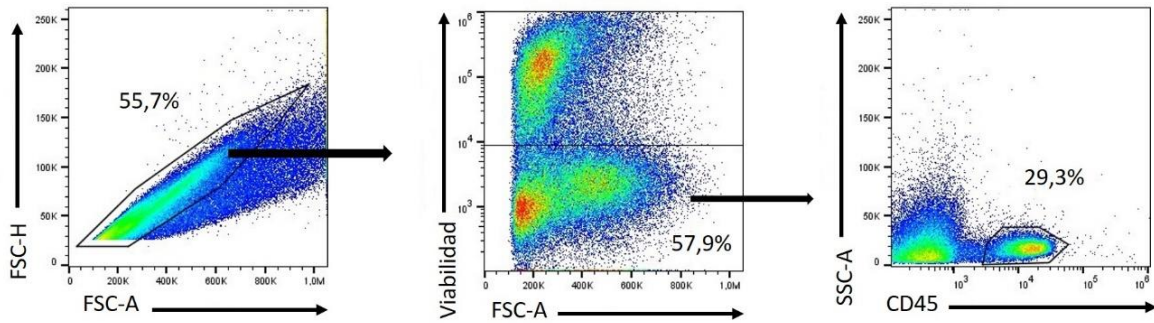
Para conocer la población de linfocitos de la muestra y diferenciarlos del resto de células presentes se aplican unas acotaciones denominados *gatings*<sup>14</sup>.

El primer filtro utilizado es identificar los singletes, ya que el citómetro no diferencia cuántas células pasan a través del haz de luz. Se asume que pasan de una en una, pero a veces pueden superponerse. El citómetro asigna un pulso a cada célula, con un área (A) y una altura (H) determinadas. La relación entre el área y la altura es constante, es decir, si las células pasan de una en una, la proporción H/A es constante. Pero en el caso de que pasen dos células a la vez, se medirá un pulso con una altura normal pero un área dos veces mayor que la correspondiente. Por lo tanto, esta población se saldrá de la media (FIGURA 4).

Para acotar la población de singletes se expresan las alturas frente a las áreas y se selecciona la población conveniente.

En segundo lugar, es necesario conocer qué células están vivas puesto que las células muertas pueden unir anticuerpos de forma no específica afectando por tanto el resultado. Para esto se ha realizado previamente la tinción con un colorante de viabilidad (*viability dye*), que marca aquellas que están muertas. En el programa se ve esta división entre poblaciones representando el marcador de viabilidad frente al tamaño de las células. La población marcada con dicho fluorocromo representa aquellas que se han teñido y, por lo tanto, que están muertas; la población negativa, en consecuencia, representa las células vivas. Este dato de positividad se conoce gracias a los controles negativos de tinción correspondiente a este marcador previamente optimizados en el laboratorio de inmunología de las mucosas del Instituto de Biología y Genética Molecular.

Dentro de las células vivas, el siguiente paso es identificar los leucocitos. Para ello se expresa la granularidad de las células frente a CD45 teñido con PE-Cy7 (se aplica este análisis por convenio). Aparece una población claramente diferenciada en la región de la derecha, que es la zona positiva según el control negativo para este marcador. Esta es la población dentro de la cual se centra el análisis. La FIGURA 4 muestra un ejemplo representativo sobre cómo se han identificado los linfocitos intraepiteliales en todos los casos.



**FIGURA 4: IDENTIFICACIÓN DE LINFOCITOS INTRAEPITELIALES.** Los linfocitos intraepiteliales, se identificaron dentro de la fracción singlete (FSC-A y FSC-H), como células viables (negativas para este marcador) que expresaban CD45.

### 5.1.2. Controles para la identificación de poblaciones

Cuando se construyen paneles de citometría de flujo multicolor, es importante la utilización de unos controles que se denominan FMOs (*Fluorescence Minus One*). Éstos determinan dónde se van a establecer los límites de cada fluorocromo.

Este proceso de control es particularmente importante cuando se quiere diferenciar una población positiva de una negativa, así como cuando los niveles de expresión son bajos. Al adquirir los datos se percibe una dispersión de fluorescencia, especialmente con los fluoróforos más brillantes, que es particularmente notable después de la compensación y la excitación cruzada con láser. Un diseño experimental cuidadoso y evitar canales que tienen una gran cantidad de difusión ayudará a reducir esta influencia, pero los controles FMO siguen siendo importantes.

Para realizar el control FMO se tiñen las células experimentales con todos los fluoróforos menos uno de ellos, como se detalla en la FIGURA 5.

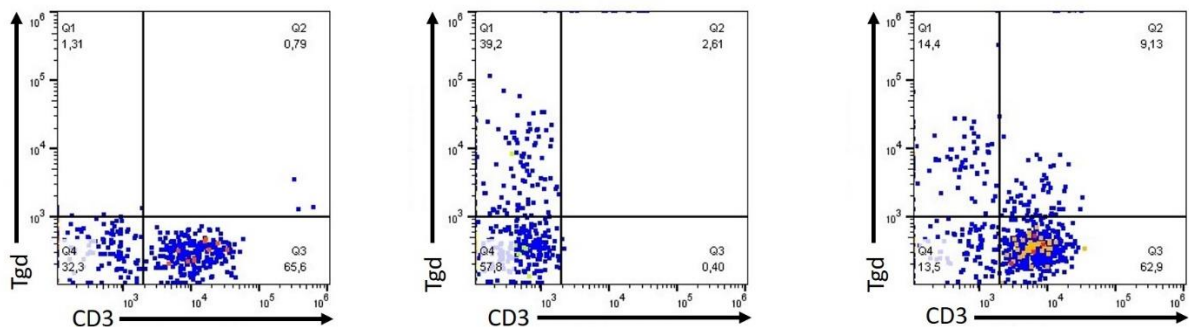
FLUOROCROMO	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8	Tubo 9
FITC	-	Tγδ	Tγδ	Tγδ	Tγδ	Tγδ	Tγδ	Tγδ	Tγδ
PE	CD16+CD56	-	CD16+CD56	CD16+CD56	CD16+CD56	CD16+CD56	CD16+CD56	CD16+CD56	CD16+CD56
PECF594	CD127	CD127	-	CD127	CD127	CD127	CD127	CD127	CD127
PE-Cy5	CD3+	CD3+	CD3+	-	CD3+	CD3+	CD3+	CD3+	CD3+
PC7	CD45	CD45	CD45	CD45	CD45	CD45	CD45	CD45	CD45
APC	CD3	CD3	CD3	CD3	-	CD3	CD3	CD3	CD3
Alexa 700	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	-	CD8	CD8	CD8
APC7	VIABLE	VIABLE	VIABLE	VIABLE	VIABLE	VIABLE	VIABLE	VIABLE	VIABLE
BV421	CD7	CD7	CD7	CD7	CD7	CD7	-	CD7	CD7
BV510	CD4	CD4	CD4	CD4	CD4	CD4	CD4	-	CD4

*FIGURA 5: TABLA DEL CONTENIDO DE CADA TUBO PARA LOS CONTROLES DE FMO (FLUORESCENCE MINUS ONE). Cada uno de los tubos contiene todos los marcadores menos uno, y el tubo 9 contiene todos ellos.*

De este modo, el tubo 1 contiene todos los fluorocromos excepto FITC y así sucesivamente, hasta el vial 9 que los contiene todos.

Esto permite analizar las regiones de positividad de cada fluorocromo.

Por ejemplo, para conocer a partir de qué intensidad es positivo CD3 se observa que todos los viales presentan una población visible excepto el vial 4. Esto permite marcar esta intensidad como punto de inflexión entre una población CD3- y CD3+. Del mismo modo se puede observar que para la población de  $T\gamma\delta$ , es el primer tubo el que no presenta dicha población mientras que el resto sí (FIGURA 6).



*FIGURA 6: CONTROLES FMO PARA LOS MARCADORES CD3 Y  $T\gamma\delta$ . La primera gráfica pertenece al tubo 1, que no contiene el marcador para  $T\gamma\delta$ . La segunda pertenece al tubo 4, que no contiene el marcador para CD3. Estas dos gráficas permiten determinar el límite de marcaje de cada especie. Se ponen en común en la última gráfica, que contiene ambos.*

Por lo tanto, gracias a este control, se pueden establecer límites poblacionales, lo que permite dividir la gráfica en cuatro poblaciones:

- Q1:  $T\gamma\delta+$  CD3-
- Q2:  $T\gamma\delta+$  CD3+ (doble positiva)
- Q3:  $T\gamma\delta-$  CD3+
- Q4:  $T\gamma\delta-$  CD3- (doble negativa)

Este mismo mecanismo, se utilizó con el resto de los marcadores para establecer sus *gatings* y con ello los límites de positividad y negatividad para cada marcador a estudio.

### 5.1.3. Variabilidad de los IEL en el duodeno humano

Como ya se ha mencionado, se conoce que dentro de los linfocitos intraepiteliales existen diversas subpoblaciones, principalmente los linfocitos CD3 clásicos, los linfocitos CD3  $\gamma\delta$  y los linfocitos NK-like. En este apartado se fenotiparon las subpoblaciones de cada una de ellas.

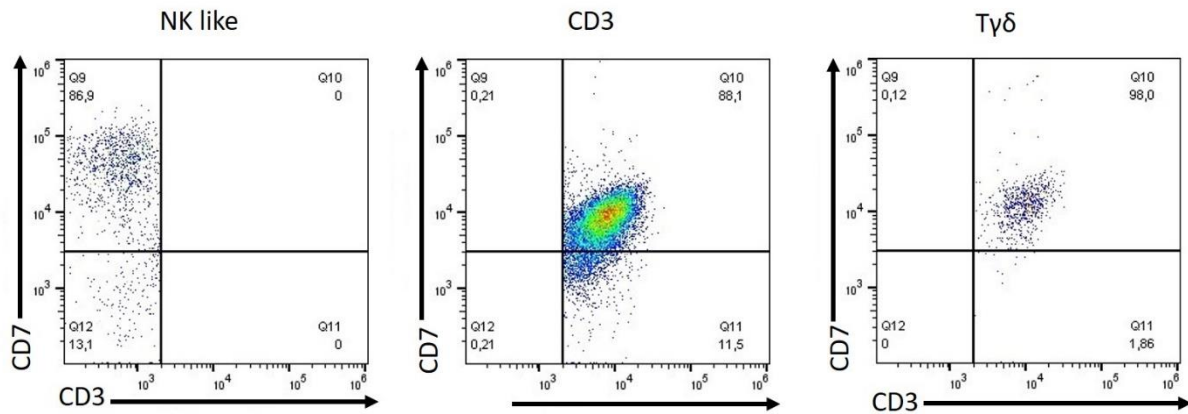


FIGURA 7: EXPRESIÓN DE CD7 EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS INTRAEPITELIALES. Se muestra la expresión de CD7 entre las diferentes poblaciones de linfocitos intraepiteliales incluyendo los linfocitos NK like, los CD3 clásicos y los T $\gamma\delta$ .

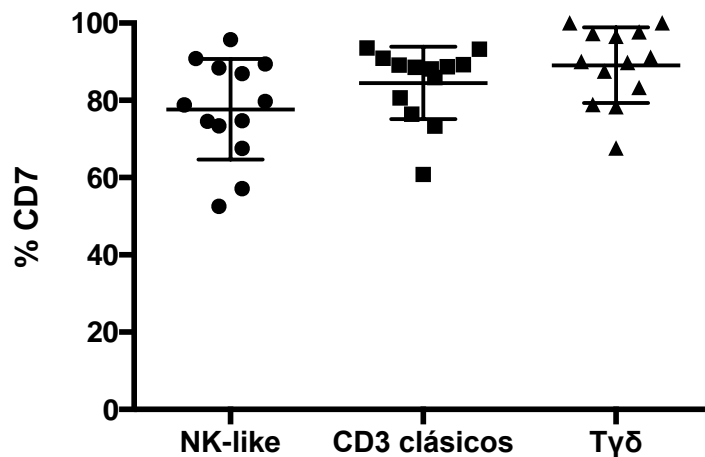
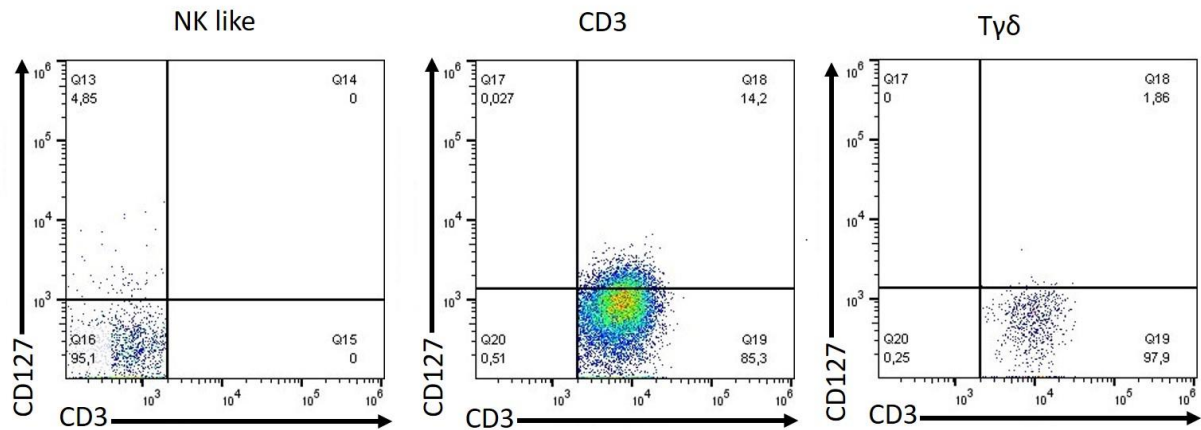
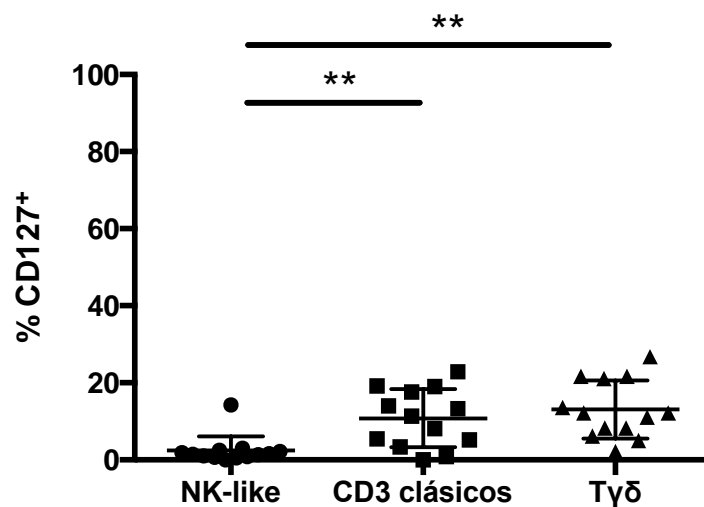


FIGURA 8: ESTADÍSTICA DE CD7 EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS INTRAEPITELIALES. Se muestran los resultados de varios experimentos independientes para la expresión de dicho marcador en las mencionadas poblaciones. Se aplicó un ANOVA con muestras pareadas realizando comparación posterior entre todos los grupos en el caso de que fuese significativa (se consideró como significativo un  $p$ -valor  $< 0,05$ ).

Tal y como muestra la Figura 8, se puede observar que CD7 se expresa para todas las subpoblaciones. Esto coincide con lo estipulado, ya que CD7 es un marcador específico de linfocitos intraepiteliales generales.



**FIGURA 9: EXPRESIÓN DE CD127 EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS INTRAEPITELIALES.** Se muestra la expresión de CD127 entre las diferentes poblaciones de linfocitos intraepiteliales incluyendo los linfocitos NK like, los CD3 clásicos y los T $\gamma\delta$ .



**FIGURA 10: ESTADÍSTICA DE CD127 EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS INTRAEPITELIALES.** Se muestran los resultados de varios experimentos independientes para la expresión de dicho marcador en las mencionadas poblaciones. Se aplicó un ANOVA con muestras pareadas realizando comparación posterior entre todos los grupos en el caso de que fuese significativa (se consideró como significativo un p-valor < 0,05).

A diferencia del marcador anterior, CD127 es un marcador que no se expresa de forma habitual en todas las poblaciones de LIE (FIGURA 10). Sin embargo, se aprecia una presencia mayor en las poblaciones de CD3 clásicos y  $\text{T}\gamma\delta$ . Por lo tanto, se puede afirmar que hay diferencias significativas entre la expresión de CD127 en NK like y CD3 clásicos y/o  $\text{T}\gamma\delta$ .

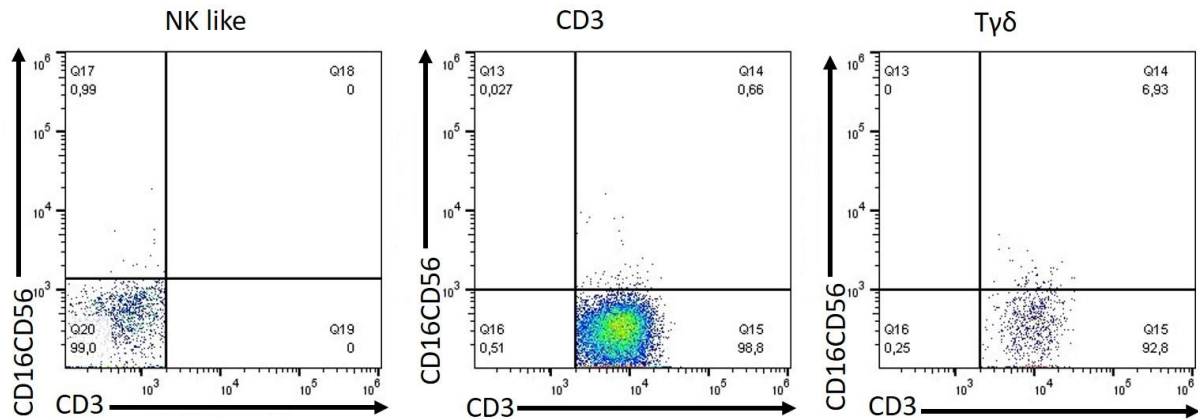


FIGURA 11: EXPRESIÓN DE CD16+CD56 EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS INTRAEPITELIALES. Se muestra la expresión de CD16+CD56 entre las diferentes poblaciones de linfocitos intraepiteliales incluyendo los linfocitos NK like, los CD3 clásicos y los  $\text{T}\gamma\delta$ .

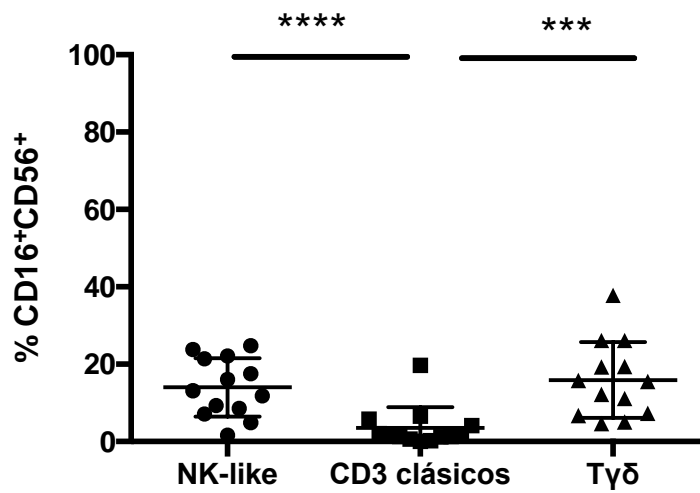


FIGURA 12: ESTADÍSTICA DE CD16+CD56 EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS INTRAEPITELIALES. Se muestran los resultados de varios experimentos independientes para la expresión de dicho marcador en las mencionadas poblaciones. Se aplicó un ANOVA con muestras pareadas realizando comparación posterior entre todos los grupos en el caso de que fuese significativa (se consideró como significativo un p-valor < 0,05).

La estadística determina que en la población en la que CD16 y CD56 más se expresa es en los T $\gamma\delta$  y en los NK like (FIGURA 12). En los CD3 clásicos tiene muy poca expresión.

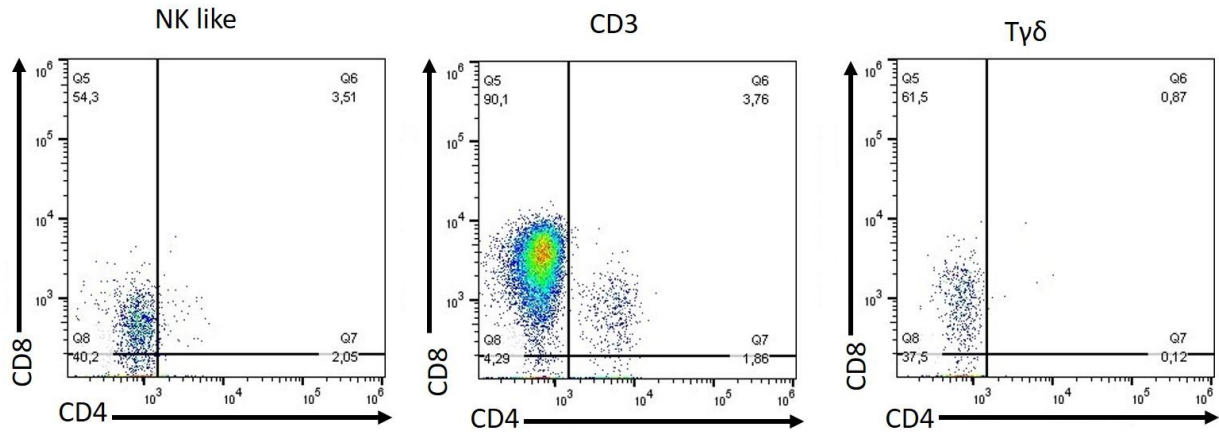


FIGURA 13: EXPRESIÓN DE CD4 Y CD8 EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS INTRAEPITELIALES. Se muestra la expresión de CD4 y CD8 entre las diferentes poblaciones de linfocitos intraepiteliales incluyendo los linfocitos NK like, los CD3 clásicos y los T $\gamma\delta$ .

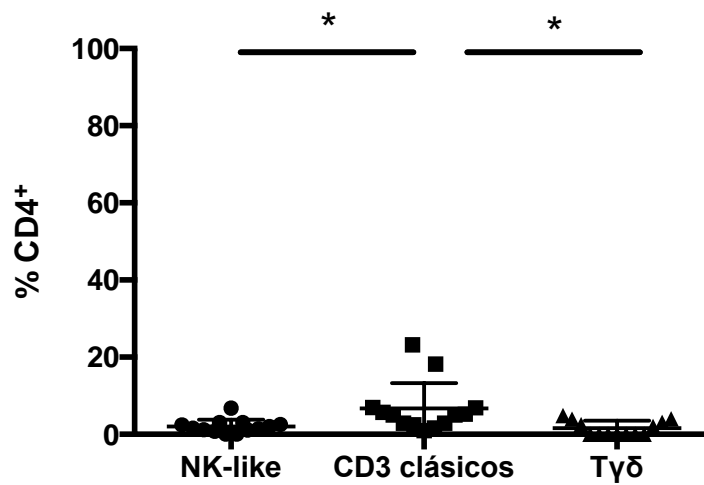


FIGURA 14: ESTADÍSTICA DE CD4 EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS INTRAEPITELIALES.



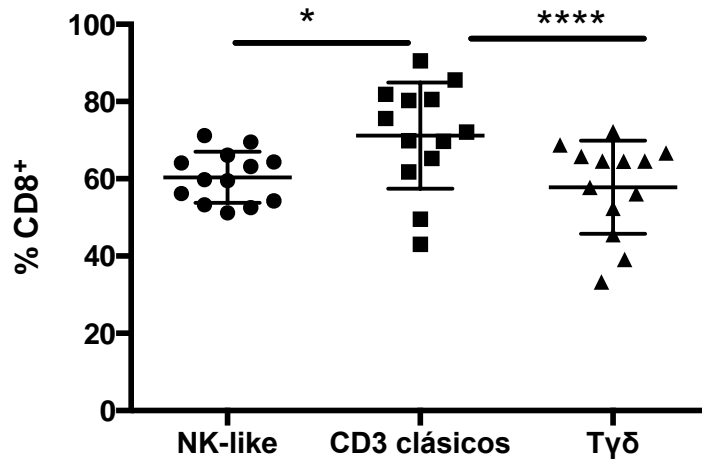


FIGURA 15: ESTADÍSTICA DE CD8 EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS INTRAEPITELIALES.

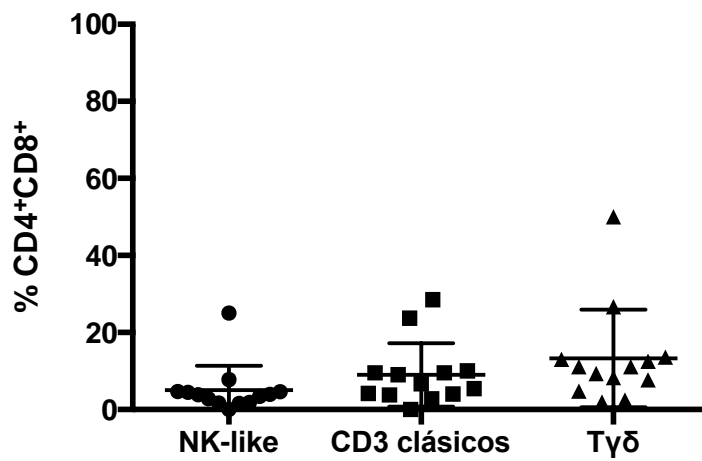


FIGURA 16: ESTADÍSTICA DE CD4+CD8+ EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS INTRAEPITELIALES.

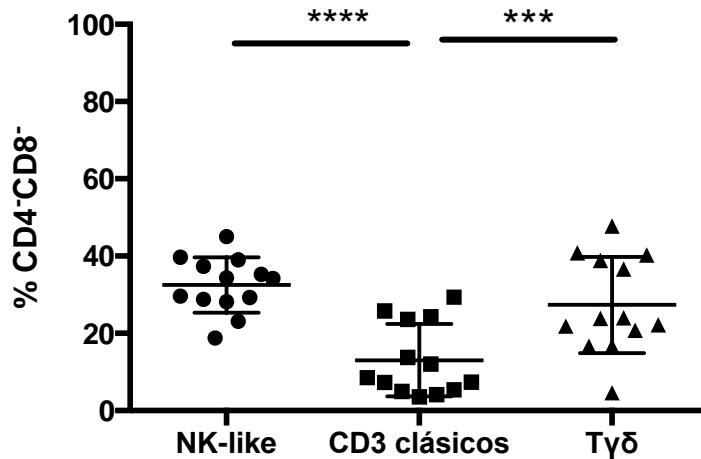


FIGURA 17: ESTADÍSTICA DE CD4-CD8- EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS INTRAEPITELIALES. En estos últimos paneles, se muestran los resultados de varios experimentos independientes para la expresión de dicho marcador en las mencionadas poblaciones. Se aplicó un ANOVA con muestras pareadas realizando comparación posterior entre todos los grupos en el caso de que fuese significativa (se consideró como significativo un p-valor < 0,05).

Observando las gráficas (FIGURA 15) se puede afirmar que CD8 es otro marcador que se manifiesta de manera habitual en todas las poblaciones de LIE, en especial en los CD3 clásicos, a diferencia de CD4 que prácticamente no se expresa (FIGURA 14).

Por otro lado, se observa que existe una leve expresión de células dobles positivas en los LIE (FIGURA 16), dato interesante ya que en sangre periférica no se manifiesta este tipo de marcador. También se expresan dobles negativos en todas ellas (FIGURA 17), siendo un poco menos frecuentes en la población de CD3 clásicos.

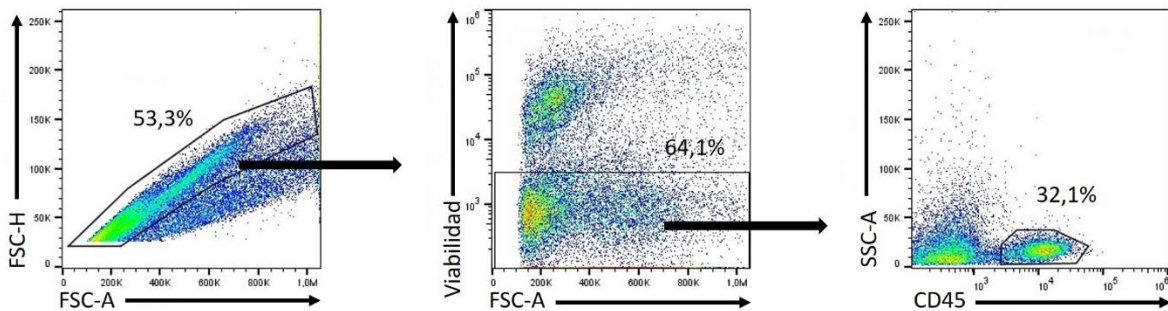
## 5.2. CONGELACIÓN DE LAS BIOPSIAS

### 5.2.1. Identificación de los IEL

#### COMPARATIVA MÉTODO CLÁSICO: FSC-H vs. FSC-A

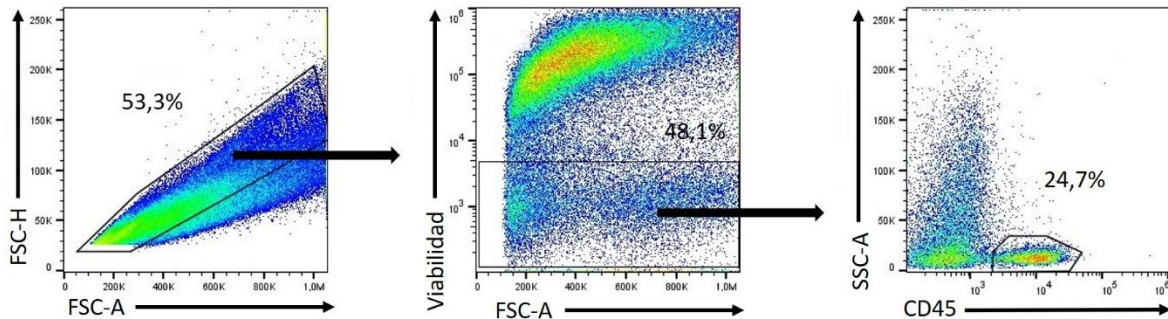
Para identificar la población de linfocitos intraepiteliales existe una forma clásica de análisis: descartar dobletes analizando FSC-H frente a FSC-A y células muertas analizando viabilidad

frente a FSC-A. Dentro de esta población se representa SSC-A frente a CD45 y se obtienen los linfocitos intraepiteliales objeto de estudio.



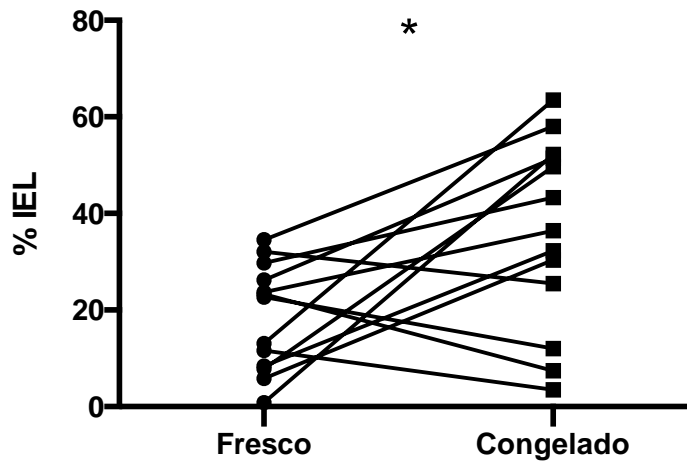
*FIGURA 18: MÉTODO CLÁSICO DE IDENTIFICACIÓN DE IEL PARA UNA MUESTRA FRESCA. Analizando una muestra fresca de este modo clásico se llega a una población de linfocitos intraepiteliales de 32.1%.*

A continuación, se analiza la muestra congelada correspondiente al mismo paciente utilizando el mismo método de identificación.



*FIGURA 19: MÉTODO CLÁSICO DE IDENTIFICACIÓN IEL PARA UNA MUESTRA CONGELADA. Con el mismo método clásico para identificar IEL en la muestra congelada pareada con la anterior se obtiene una población de 24.7%.*

A pesar de que se trata del mismo paciente, los porcentajes de linfocitos intraepiteliales identificados no coinciden. Para ver si existen diferencias significativas o no entre las muestras frescas y congeladas en todos los casos se realiza un estudio estadístico que se muestra a continuación (FIGURA 20).



*FIGURA 20: ESTADÍSTICA COMPARATIVA MUESTRAS FRESCAS VS. MUESTRAS CONGELADAS PARA LA POBLACIÓN DE IEL - MÉTODO CLÁSICO. Se observan cuatro casos en los que la población disminuye, a pesar de que la tendencia general parece determinar un aumento. Por lo tanto, se puede afirmar que existen diferencias significativas entre los valores obtenidos a partir de las muestras frescas y los obtenidos a partir de las congeladas.*

Estos resultados evidencian que los valores de LIE identificados en muestras frescas y congeladas no coinciden. Sin embargo, es preciso analizar también los porcentajes de las subpoblaciones para conocer si también presentan diferencias.

Para ello, se analiza  $T\gamma\delta$  frente a CD3 clásicos y se obtienen los siguientes cuadrantes. Cada uno de ellos corresponde a una subpoblación:

- Cuadrante Q4: linfocitos NK like
- Cuadrante Q3: linfocitos CD3 clásicos
- Cuadrante Q2: linfocitos  $T\gamma\delta$

En la FIGURA 21 se muestra la asignación de cada cuadrante a cada población. Se trata de un ejemplo representativo de uno de los pacientes.

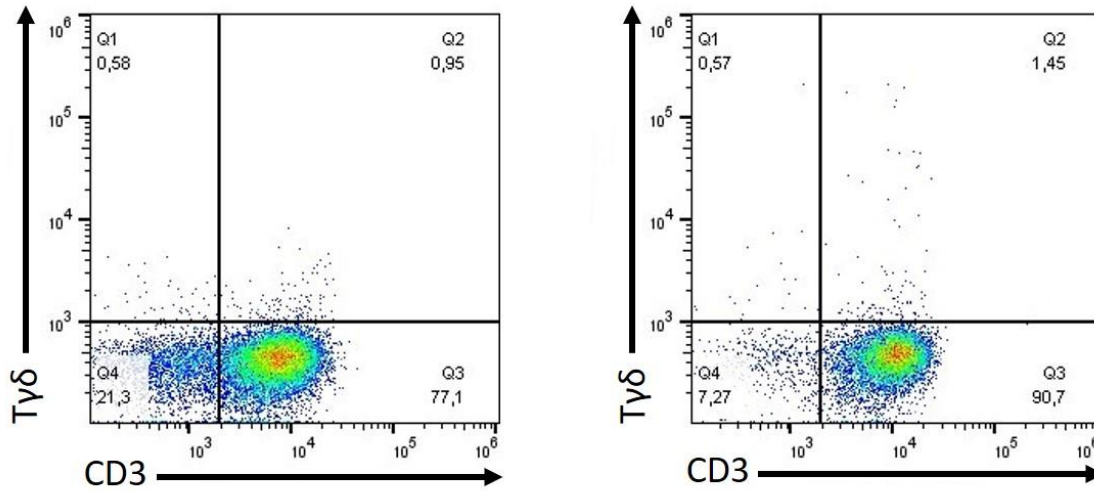


FIGURA 21: Tyδ frente a CD3 de muestra fresca vs. muestra congelada con método de identificación clásico. Comparando las gráficas puede apreciarse una disminución del porcentaje de la subpoblación de linfocitos NK like, ya que pasa de 21.3% en la muestra fresca a 7.21% en la muestra congelada. Asimismo, se observan variaciones en las otras dos poblaciones.

Las estadísticas muestran los resultados obtenidos de todas las muestras.

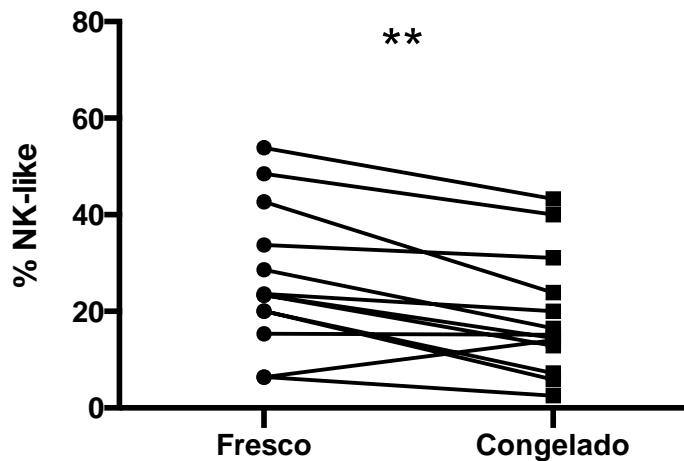


FIGURA 22: ESTADÍSTICA COMPARATIVA MUESTRAS FRESCAS VS. MUESTRAS CONGELADAS PARA LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS NK LIKE MEDIANTE EL MÉTODO CLÁSICO. En la mayoría de los casos se observa un descenso pronunciado en la población de los linfocitos NK like.

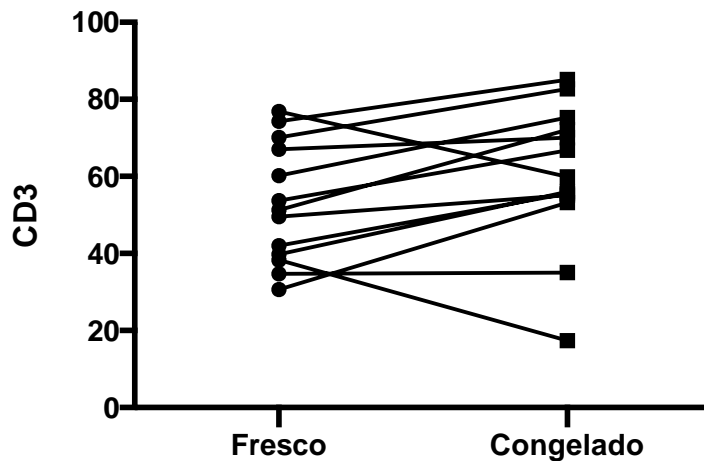


FIGURA 23: ESTADÍSTICA COMPARATIVA MUESTRAS FRESCAS VS. MUESTRAS CONGELADAS PARA LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS CD3 CLÁSICOS MEDIANTE EL MÉTODO CLÁSICO. En las poblaciones de CD3 clásicos también se observan diferencias entre las muestras frescas y congeladas, pudiéndose apreciar un leve aumento en la mayoría de los casos.

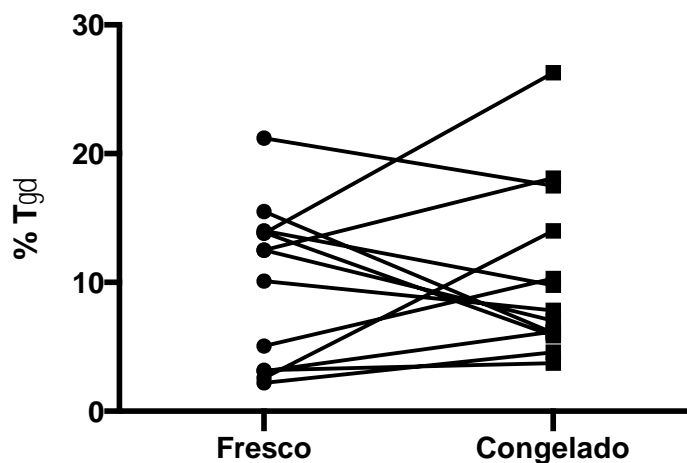


FIGURA 24: ESTADÍSTICA COMPARATIVA MUESTRAS FRESCAS VS. MUESTRAS CONGELADAS PARA LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS  $T\gamma\delta$  MEDIANTE EL MÉTODO CLÁSICO. Ocurre lo mismo para el caso de las poblaciones de linfocitos  $T\gamma\delta$ , se observan grandes cambios entre las muestras frescas y las congeladas. En este caso es más complicado observar una tendencia, ya que en algunos casos hay un aumento porcentual y en otros se aprecia un descenso.

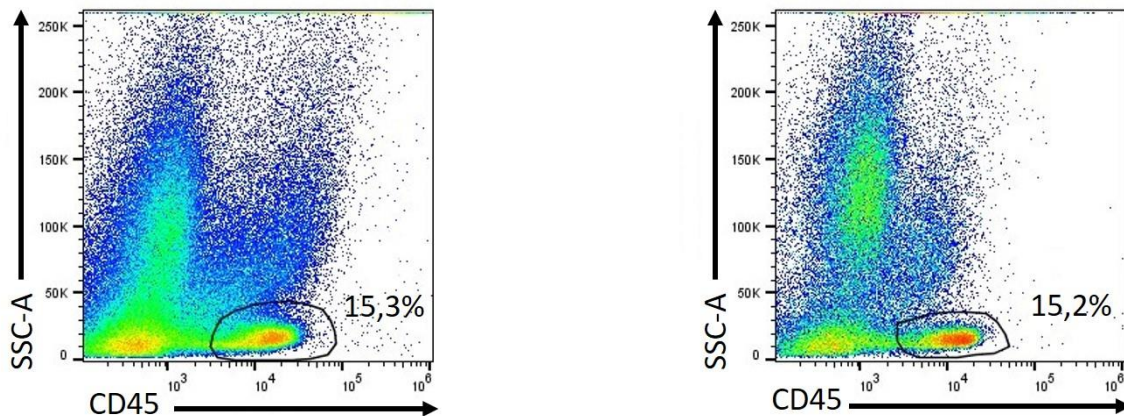
El análisis estadístico de las poblaciones, tanto de linfocitos intraepiteliales generales como de subpoblaciones, evidencia que existen diferencias significativas entre muestras frescas y

congeladas, por lo tanto, es necesario buscar un nuevo método para identificar poblaciones en el que no se aprecie variación a la hora de comparar muestras.

#### COMPARATIVA NUEVO MÉTODO: CD45 vs. SSC

Ya que el método clásico no es concluyente porque todas las muestras congeladas presentan una clara variación de la población leucocitaria, es preciso buscar otro mecanismo de análisis para identificar los linfocitos intraepiteliales.

Se ha probado analizando directamente SSC-A frente a CD45, evitando los pasos de acotar los singletes y las células vivas, y se ha observado que no existen diferencias entre las poblaciones de las muestras frescas y de las congeladas (FIGURA 25).



*FIGURA 25: MÉTODO NUEVO DE IDENTIFICACIÓN DE IEL EN MUESTRA FRESCA VS. MUESTRA CONGELADA. Analizando directamente granularidad frente al marcador CD45 no se observan diferencias entre los porcentajes de la población leucocitaria de la muestra fresca y la muestra congelada.*

Para verificar que este método se adecúa a todos los casos, se realiza el análisis estadístico habitual con todos los datos de las muestras.

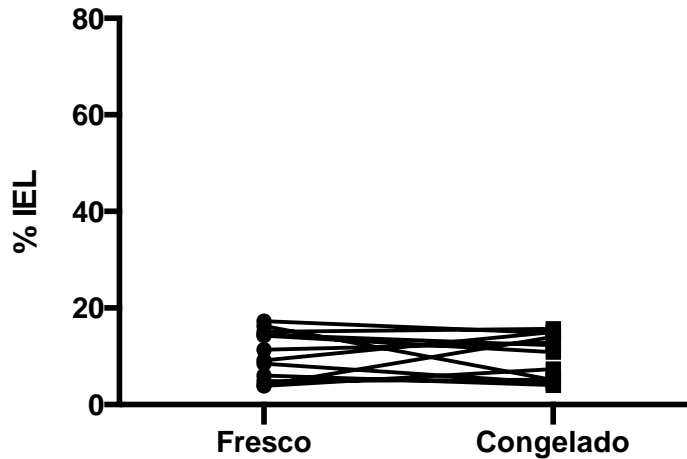


FIGURA 26: ESTADÍSTICA COMPARATIVA MUESTRAS FRESCAS VS. MUESTRAS CONGELADAS PARA LA POBLACIÓN DE IEL - MÉTODO NUEVO. Los porcentajes de linfocitos intraepiteliales presentan apenas variación comparando las muestras frescas con las congeladas.

Mediante este nuevo método no se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de LIE obtenidos a partir de las muestras frescas y sus correspondientes muestras congeladas. Por lo tanto, este es el método más adecuado para identificar la población de linfocitos objeto de estudio.

En cualquier caso, y una vez que los LIE han sido identificados de forma correcta, para poder analizar las subpoblaciones sin errores es necesario eliminar los dobletes y las células muertas, por lo que se aplican los dos filtros utilizados anteriormente: para reunir únicamente los singletes y posteriormente para agrupar las células vivas.

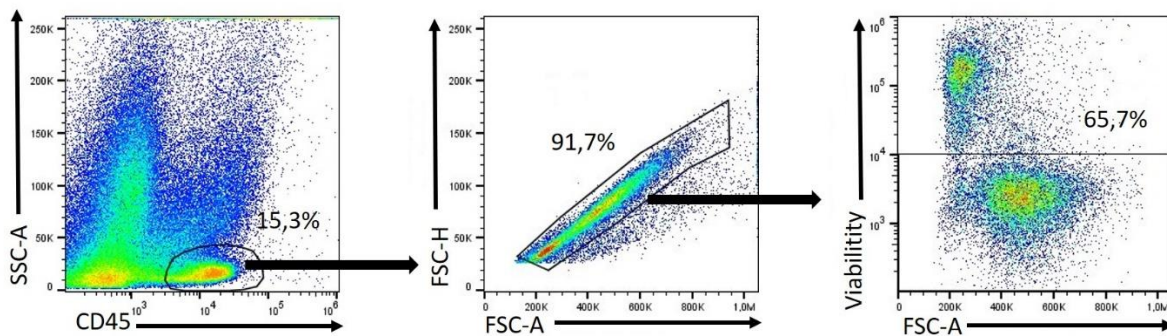
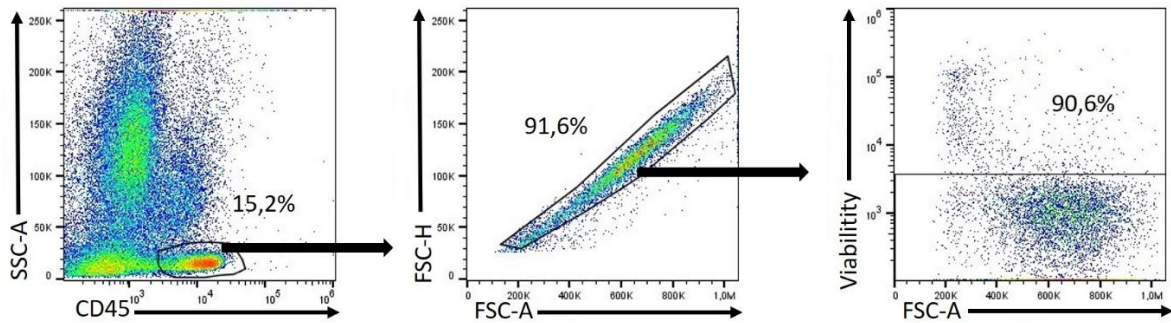


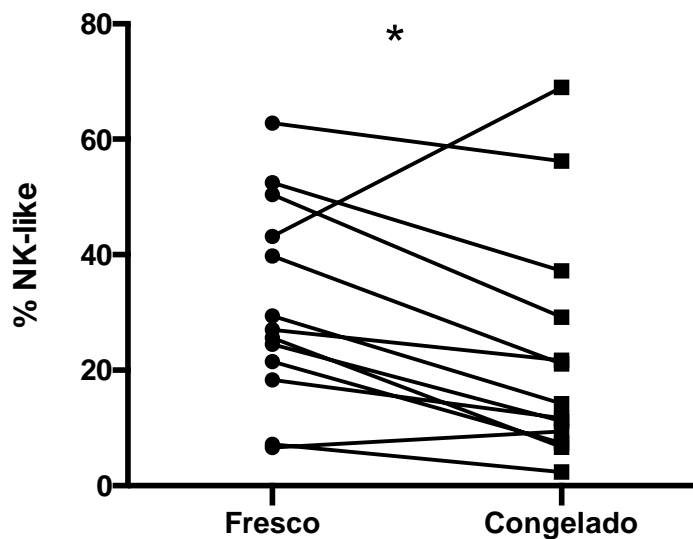
FIGURA 27: ANÁLISIS DE MUESTRA FRESCA CON NUEVO MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN DE IEL. Identificación de LIE mediante el nuevo método en una muestra fresca.





**FIGURA 28: ANÁLISIS DE MUESTRA CONGELADA CON NUEVO MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN DE IEL. Identificación de LIE mediante el nuevo método en una muestra congelada.**

Del mismo modo que antes, es preciso comprobar si este método se puede aplicar para obtener todas las subpoblaciones. Para ello, se realizan los estudios estadísticos correspondientes que se muestran en las figuras a continuación.



**FIGURA 29: ESTADÍSTICA COMPARATIVA MUESTRAS FRESCAS VS. MUESTRAS CONGELADAS PARA LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS NK LIKE MEDIANTE EL MÉTODO NUEVO. Se observan las variaciones para la población de NK like. En el caso de esta población, se observan diferencias significativas.**

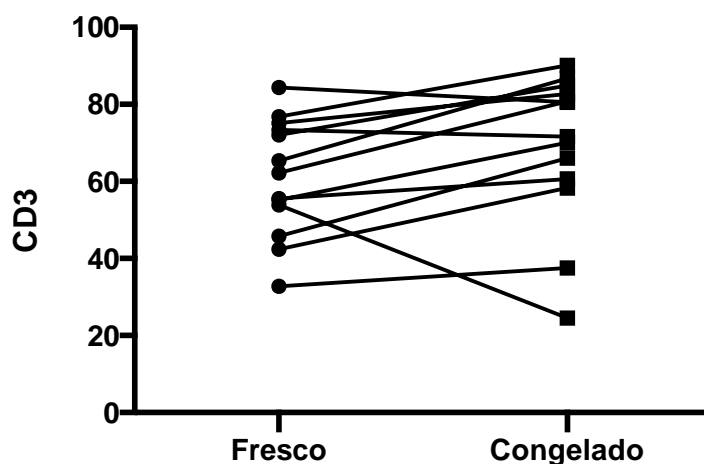


FIGURA 30: ESTADÍSTICA COMPARATIVA MUESTRAS FRESCAS VS. MUESTRAS CONGELADAS PARA LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS CD3 CLÁSICOS MEDIANTE EL MÉTODO NUEVO. Se representan los valores obtenidos para las poblaciones de CD3 clásicos. Apenas existe variación entre las parejas.

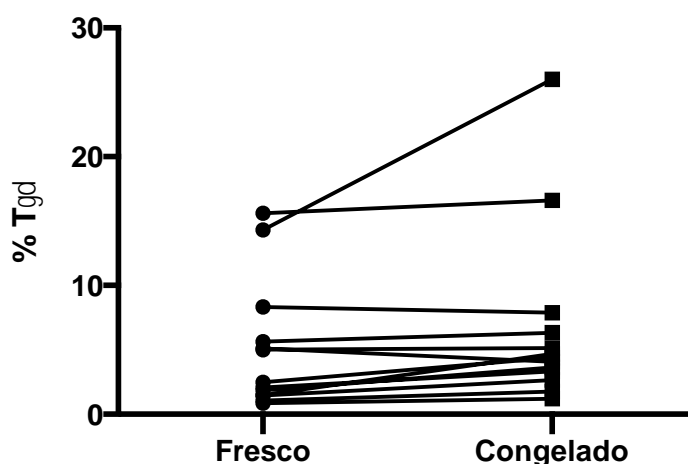


FIGURA 31: ESTADÍSTICA COMPARATIVA MUESTRAS FRESCAS VS. MUESTRAS CONGELADAS PARA LAS SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS  $T\gamma\delta$  MEDIANTE EL MÉTODO NUEVO. Se obtienen los datos correspondientes a la subpoblación de  $T\gamma\delta$ . Esta es la que menos variación presenta; los valores se mantienen prácticamente constantes para cada pareja.

A grandes rasgos, se puede afirmar que este método de identificación es más adecuado que el clásico, ya que en todos los casos las poblaciones presentan menor variación si bien el porcentaje de linfocitos NK-like se encuentra disminuido tras la congelación de las células.

### 5.2.2. Comparativa frescas vs congeladas para cada marcador en cada subpoblación

Otra característica interesante que analizar, para poder afirmar con total seguridad que la criopreservación es una técnica aceptable que no promueve cambios en las células, es el fenotipo que presentan las subpoblaciones. Es decir, lo que se busca en este apartado es conocer si las células estudiadas presentan el mismo fenotipo tras su congelación. Para ello, se analiza la manifestación de cada marcador para los tres tipos de subpoblaciones en cada pareja de muestras mediante un estudio cualitativo.

Si cada marcador se expresa tanto en la muestra fresca como en la congelada, se puede afirmar que la criopreservación no altera el fenotipo de las células.

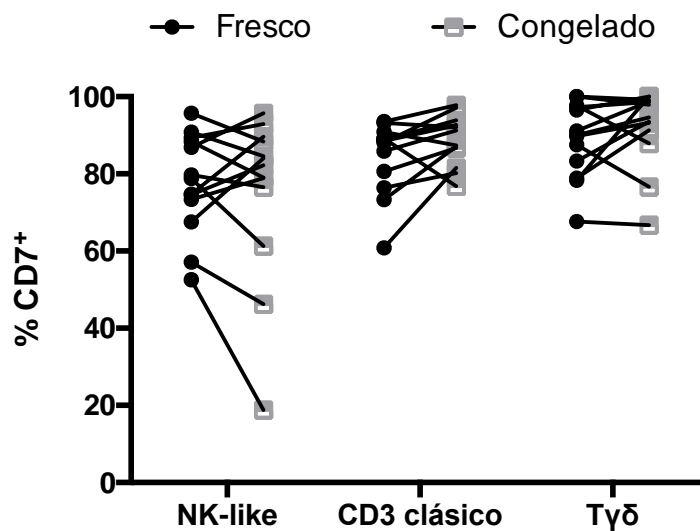


FIGURA 32: COMPARATIVA MUESTRAS FRESCAS VS. MUESTRAS CONGELADAS PARA EL MARCADOR CD7 EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS INTRAEPITELIALES. El marcador CD7 se manifiesta en todas las poblaciones de forma equivalente para las muestras frescas y congeladas.

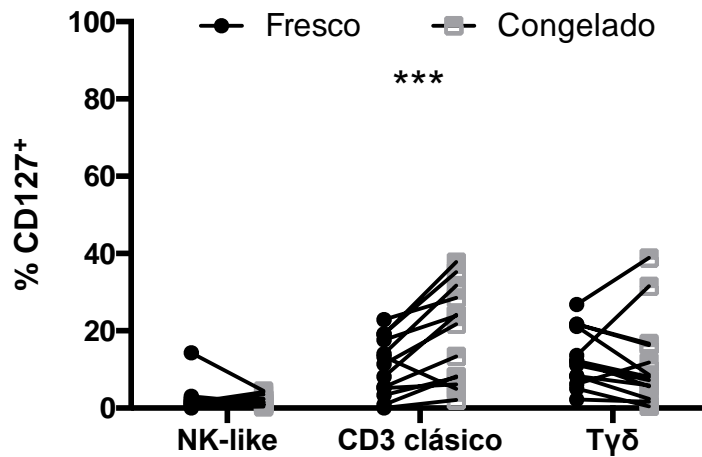


FIGURA 33: COMPARATIVA MUESTRAS FRESCAS VS. MUESTRAS CONGELADAS PARA EL MARCADOR CD127 EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS INTRAEPITELIALES. El marcador CD127 no se expresa prácticamente para la población de NK like, tanto en frescas como en congeladas. Sin embargo, en la poblaciones de CD3 clásicos hay una expresión mayor en las muestras congeladas.

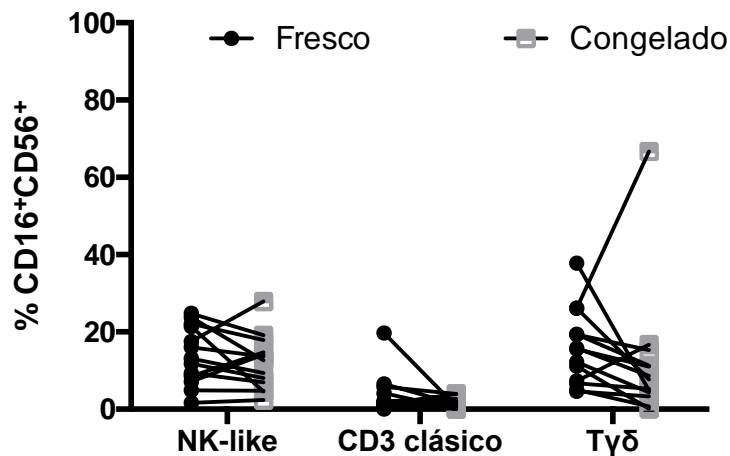


FIGURA 34: COMPARATIVA MUESTRAS FRESCAS VS. MUESTRAS CONGELADAS PARA EL MARCADOR CD16+CD56 EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS INTRAEPITELIALES. El marcador CD16+CD56 no se expresa en los CD3 clásicos mientras que en las poblaciones de NK like y Tγδ se observa una manifestación mayor, equiparable para frescas y congeladas.

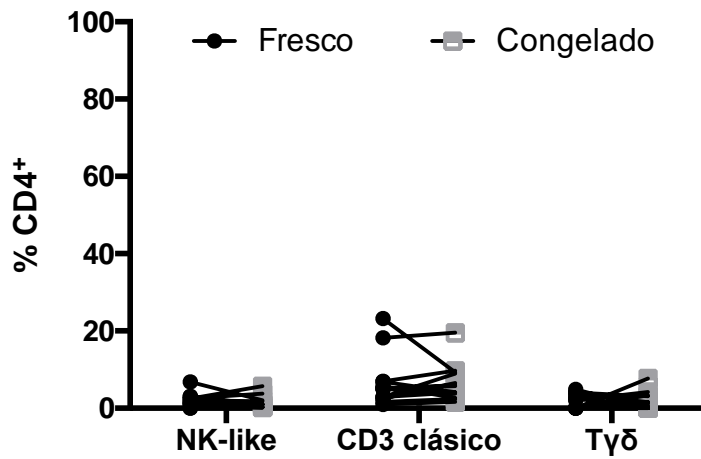


FIGURA 35: COMPARATIVA MUESTRAS FRESCAS VS. MUESTRAS CONGELADAS PARA EL MARCADOR CD4 EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS INTRAEPITELIALES. El marcador CD4 tiene una expresión igualable en muestras frescas y muestras congeladas; no se expresa en ninguna de las poblaciones.

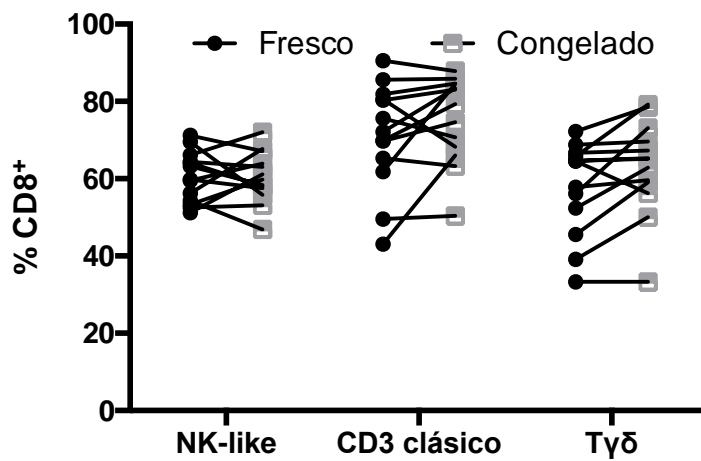


FIGURA 36: COMPARATIVA MUESTRAS FRESCAS VS. MUESTRAS CONGELADAS PARA EL MARCADOR CD8 EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS INTRAEPITELIALES. El marcador CD8 tiene una expresión igualable en muestras frescas y muestras congeladas; presenta una alta manifestación.

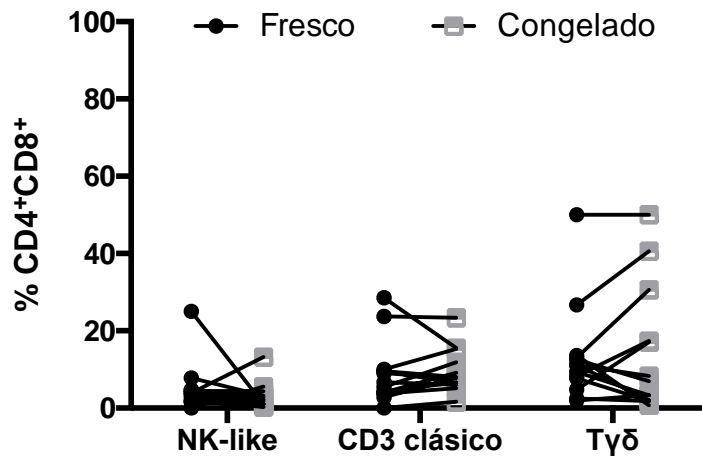


FIGURA 37: COMPARATIVA MUESTRAS FRESCAS VS. MUESTRAS CONGELADAS PARA EL MARCADOR CD4+CD8+ EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS INTRAEPITELIALES. Asimismo, se puede afirmar que tampoco hay diferencias entre la expresión de la población doble positiva entre las muestras frescas y congeladas.

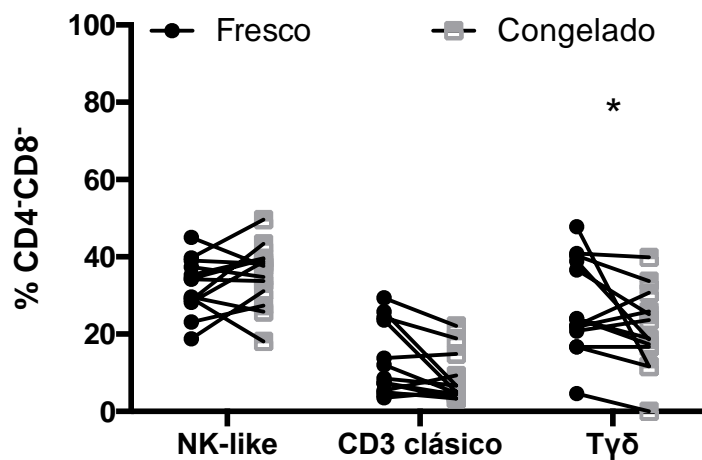


FIGURA 38: COMPARATIVA MUESTRAS FRESCAS VS. MUESTRAS CONGELADAS PARA EL MARCADOR CD4-CD8- EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS INTRAEPITELIALES. La población negativa para los marcadores CD4 y CD8 se expresa de igual manera para frescas y congeladas en todas las poblaciones de linfocitos, disminuyendo su porcentaje en la población Tγδ tras el congelado.

En todas ellas se puede observar que el fenotipo se mantiene prácticamente intacto, ya que todas aquellas que manifiestan un marcador en fresco lo expresan también tras su congelación. Esto permite afirmar que la criopreservación es una técnica que no afecta a las características tanto estructurales como fisicoquímicas de los linfocitos intraepiteliales y por lo tanto la habilita para su utilización en el diagnóstico de enfermedad celíaca.





## **6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS**

Atendiendo a los resultados expuestos en el apartado anterior cabe realizar una interpretación de estos para concluir el estudio y dar a conocer si se han cumplido los objetivos propuestos.

### **6.1. INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS**

Se han estudiado los linfocitos intraepiteliales que presentan las biopsias extraídas del duodeno. Se conoce que el recuento de este tipo de células presentes en el epitelio intestinal es determinante para conocer si existe o no inflamación.

Este estudio está enfocado al diagnóstico de la enfermedad celíaca, por lo tanto, dentro de la población de linfocitos intraepiteliales, se centra en dos subpoblaciones en concreto: los linfocitos  $T\gamma\delta$  y los linfocitos NK like. Además de estas también se ha analizado la población de linfocitos CD3 clásicos, necesarios para identificar las otras 2 poblaciones.

Los marcadores que contiene la tinción aplicada son los responsables de la caracterización fenotípica de las dos subpoblaciones en cuestión; se pretende demostrar que estos linfocitos expresan el mismo tipo de marcador habiendo sido procesados en fresco o tras su congelación<sup>15</sup>.

Los datos obtenidos demuestran que la naturaleza fisicoquímica de los linfocitos intraepiteliales, así como su fenotipo no se ven alteradas a grandes rasgos tras su congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ . También se puede afirmar, gracias a los porcentajes de cada subpoblación (NK like, CD3 clásicos y  $T\gamma\delta$ ) analizada, que el recuento de linfocitos no varía en exceso comparando las muestras frescas con las congeladas. La interpretación de estos resultados es muy clara: la técnica de criopreservación funciona de forma correcta y se puede aplicar para realizar linfogramas intraepiteliales para el diagnóstico de EC.

### **6.2. DIAGNÓSTICO**

Como ya se ha comentado previamente, se conoce que el diagnóstico de la enfermedad celíaca es poco concluyente en la mayoría de los casos. Mediante la realización de un

linfograma intraepitelial se puede aclarar si existe o no inflamación intestinal. Por ello, es una técnica muy importante a la hora de evaluar si existe esta enfermedad.

En este trabajo se ha demostrado que la criopreservación es una técnica válida para conservar las biopsias intestinales y, por lo tanto, esto habilita la posibilidad de realizar esta prueba a hospitales que no cuenten con el equipamiento correspondiente.

A pesar de que los datos son estadísticamente aceptables, es preciso realizar un ajuste en el porcentaje de NK like.

Se ha observado que el porcentaje de NK like disminuye en 10 unidades de media al ser la muestra congelada. Se conoce que por debajo del 20% de NK like existe inflamación en el paciente. Tal y como se muestra en el gráfico, se dan casos en los que la muestra fresca sitúa la población de NK like por encima del 20% y su pareja congelada la sitúa por debajo. Esto supone un problema ya que implicaría un diagnóstico diferente para cada muestra. El ajuste realizado para solventar este problema es marcar diferentes límites porcentuales de NK like en fresco y congelado para determinar si existe inflamación o no; en fresco se mantiene en 20% y en congelado se baja hasta el 10%. De este modo el diagnóstico será pareado en todas las muestras.

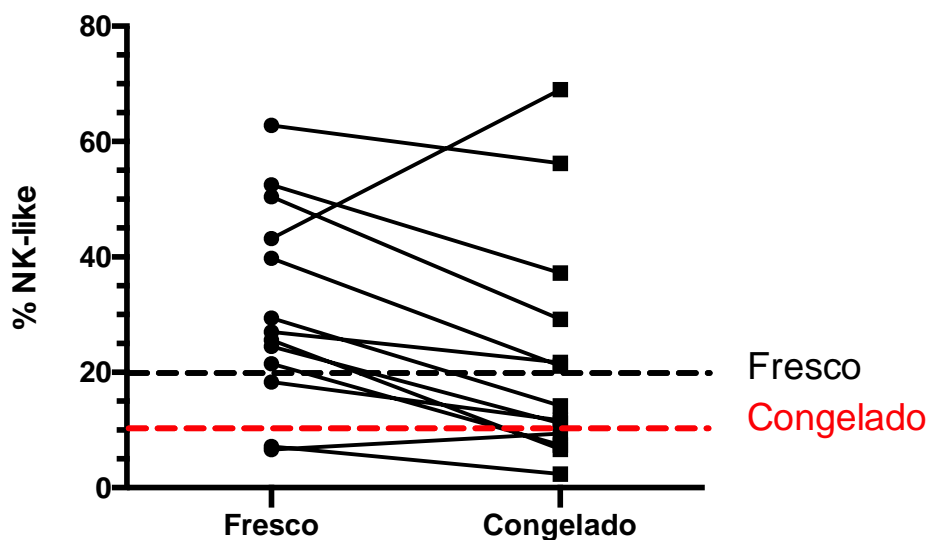


FIGURA 39: AJUSTE PORCENTUAL DE NK LIKE LÍMITE PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD CELÍACA. Para las muestras frescas el límite determinante de inflamación se mantiene en 20% de NK like mientras que el límite para las muestras congeladas se disminuye hasta el 10% puesto que los datos presentan valores menores (aproximadamente de 10 unidades).

### **6.3. REPERCUSIÓN SOCIAL Y CIENTÍFICA**

Como ya se ha comentado en el primer apartado, el diagnóstico de la enfermedad celíaca no es sencillo y por desgracia, hasta ahora, esta técnica no se podía aplicar en muchos hospitales. Con este estudio se solventa este problema y se optimiza su realización.

Gracias a la posibilidad de poder conservar las biopsias extraídas, se puede realizar una recolección de muestras hasta contar con un buen número de ellas para procesar de forma simultánea y así ahorrar tiempo y material. Del mismo modo, se pueden recoger muestras en múltiples centros y que sean transportadas a uno que cuente con el equipamiento correspondiente para realizar el linfograma. Por lo tanto, este estudio supone un aumento del espectro de centros que puedan realizar esta prueba de diagnóstico.

Además de esto, es preciso tener en cuenta que la obtención de las muestras no es un proceso sencillo. Se trata de una intervención previamente establecida al paciente, es decir, se lleva a cabo a una hora determinada y no permite variaciones. Antes de realizar este estudio, la muestra debía procesarse inmediatamente después de su extracción, pero gracias a la posibilidad de preservarla, esto ya no es necesario. Como consecuencia, se facilita el trabajo tanto del personal clínico como del personal de laboratorio.

Sin embargo, lo ideal para poder afirmar con totalidad que esta técnica de preservación se puede aplicar en todos los casos, sería aumentar N, ya que en este estudio se ha contado con 13 pacientes. Se trata de un público de espectro amplio ya que fueron de todas las edades y de ambos géneros. Aun así, siempre es adecuado aumentar el número de pruebas para garantizar con exactitud que el método funciona.

### **6.4. PERSPECTIVAS DE FUTURO**

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, los pacientes que han participado en este estudio son de ambos géneros y diferentes edades. Esto ha permitido observar una variación en función de estas dos variables. Puesto que este no era el objetivo de este estudio, no se han presentado los datos correspondientes. No obstante, como proyecto futuro se puede plantear la posibilidad de estudiar las tendencias que se observan en las poblaciones

linfocitarias en función del género y la edad, puesto que, hasta ahora, solamente se conocen estas diferencias en pacientes sanos<sup>16</sup>.

Otro dato de interés que se ha observado durante la realización de los experimentos es un ligero aumento de las células viables tras la preservación de las biopsias. La hipótesis que se ha planteado para explicar este hecho es la siguiente: el estrés celular. Las células al ser extraídas se ven sometidas a un proceso traumático, por lo que muchas de ellas mueren. En el caso de que sean procesadas de forma consecutiva, un mayor número de ellas sufrirán la apoptosis. Por el contrario, si tras su extracción se congelan, el tejido tendrá la habilidad de recuperarse antes de su procesado. Sobre la base de las ideas expuestas cabría la posibilidad de realizar un estudio.

## **6.5. CONCLUSIONES**

Para finalizar, se puede afirmar que los objetivos propuestos en este estudio se han cumplido y se ha habilitado un nuevo campo de aplicación científica en el mundo clínico.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

<sup>1</sup>Riestra S, Fernández E, Rodrigo L, Garcia S, Ocio G. (April 2000) Prevalence of Coeliac disease in the general population of northern Spain. Strategies of serologic screening. *Scandinavian Journal of Gastroenterology (Vol 35)*. 398-402.

<sup>2</sup>Polanco Allué I., Ribes Koninckx C. Enfermedad celíaca. *Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (SEGHNPAEP)*.

<sup>3</sup>Fernández-Bañares F., Carrasco A., Martín A., Esteve M. (August 2019) Systematic Review and Meta-Analysis Accuracy of Both Gamma Delta+ Intraepithelial Lymphocytes and Coeliac Lymphogram Evaluated by Flow Cytometry for Coeliac Disease Diagnosis. *Nutrients (Vol 11)*.

<sup>4</sup>Mowat A. Mcl. (February 2018) To respond or not to respond – A personal perspective of intestinal tolerance. *Nature Reviews (Perspectives)*.

<sup>5</sup>Verbeek, W., Goerres M., Von Blomberg M., Oudejans J., Scholten P., Hadithi M., Al-Toma A., Schreurs M., Mulder C. (2008) Flow cytometric determination of aberrant intra-epithelial lymphocytes predicts T-cell lymphoma development more accurately than T-cell clonality analysis in Refractory Celiac Disease. *Clinical Immunology (Vol 126)*. 48-56.

<sup>6</sup>Tsai Y., Czerwinski M., Wu A., Dame M., Attili D., Hill E., Colacino J., Nowacki L. M., Shroyer N., Higgins P., Kao J., Spence J. (May 2018) A Method for Cryogenic Preservation of Human Biopsy Specimens and Subsequent Organoid Culture. *Celular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 218-222.

<sup>7</sup>Universidad de Salamanca. Marcadores usados en clínica para: Linfocitos T, B y NK. Recuperado de: <https://campus.usal.es/~histologia/practica/2-epitelial-conectivo/lamina026/lamina11b/lamina11b.htm>

<sup>8</sup>T. *Wikipedia*. Recuperado de [https://es.wikipedia.org/wiki/Linfocito\\_T](https://es.wikipedia.org/wiki/Linfocito_T)

<sup>9</sup>Montalban-Arques A., Chaparro M., Gisbert J. P., Bernardo D. The innate immune system in the gastrointestinal tract: role of intraepithelial lymphocytes and lamina propria innate lymphoid cells in intestinal inflammation. *Inflammatory Bowel Diseases (IBD-D-17-01002R2)*.

<sup>10</sup>León F., Sánchez L., Camarero C., Roy G. (March 2005) Cytokine production by intestinal intraepithelial lymphocyte subsets in celiac disease. *Digestive diseases and sciences*. 593-600.

<sup>11</sup>Sánchez-Muñoz LB, Santón A., Cano A., López A., Almeida J., Orfao A., Escribano L., Roy G. (May 2008) Flow cytometric analysis of intestinal intraepithelial lymphocytes in the diagnosis of refractory celiac sprue. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 478-87.

<sup>12</sup>Iwasa, J., Brauneis, A., Alemán, L. "Flow Cytometry Animation" Star Cell Bio. Massachusetts Institute of Technology

<sup>13,14</sup>Bernardo D. (2008) *Interacciones innato-adaptativas en el sistema inmune y su relación con la patogenia de la enfermedad celíaca* (Tesis Doctoral). Instituto de Biología y Genética Molecular de la Universidad de Valladolid, Valladolid.

<sup>15</sup>Konnikova L., Boschetti G., Rahman A., Mitsialis V., Lord J., Richmond C., Tomov V. T., Gordon., Jelinsky., Canavan., Liss A., Wall S., Field M., Zhou F., Goldsmith J., Bewtra M., Breault D., Merad M., Snapper S. (August 2018) High-dimensional immune phenotyping and transcriptional analyses reveal robust recovery of viable human immune and epithelial cells from frozen gastrointestinal tissue. *Mucosal Immunology* 2018, 1684-1693.

<sup>16</sup>Camarero C., León F., Sánchez L., Asensio A., Roy G. (January 2007) Age-Related Variation of Intraepithelial Lymphocytes Subsets in Normal Human Duodenal Mucosa. *Digestive diseases and sciences* 2007. 685-91.

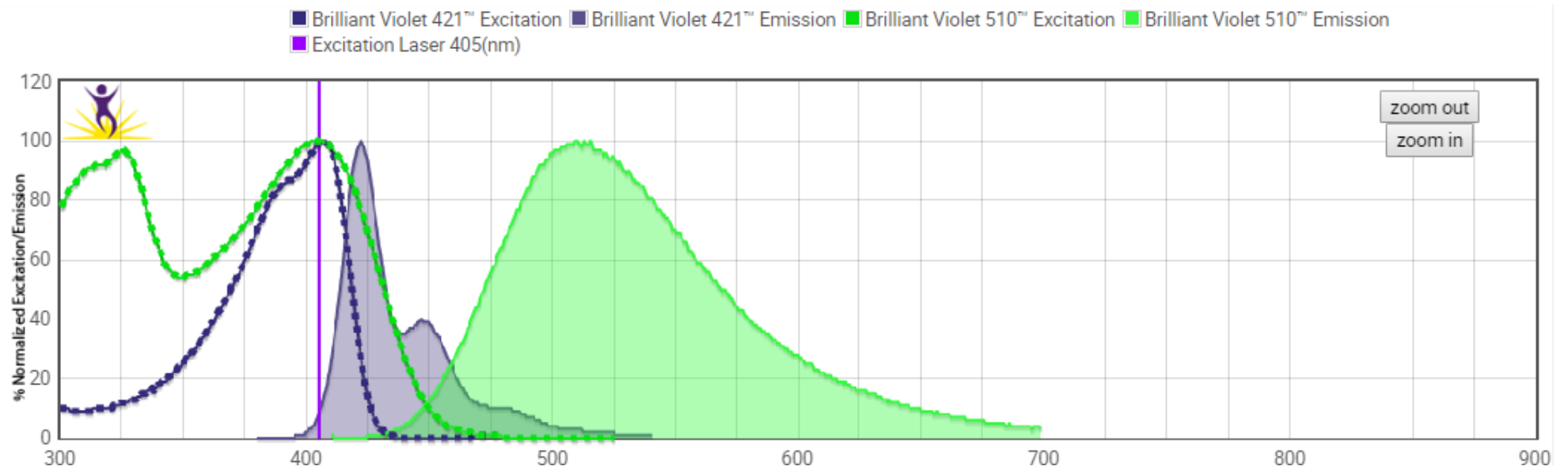




## 8. ANEXOS

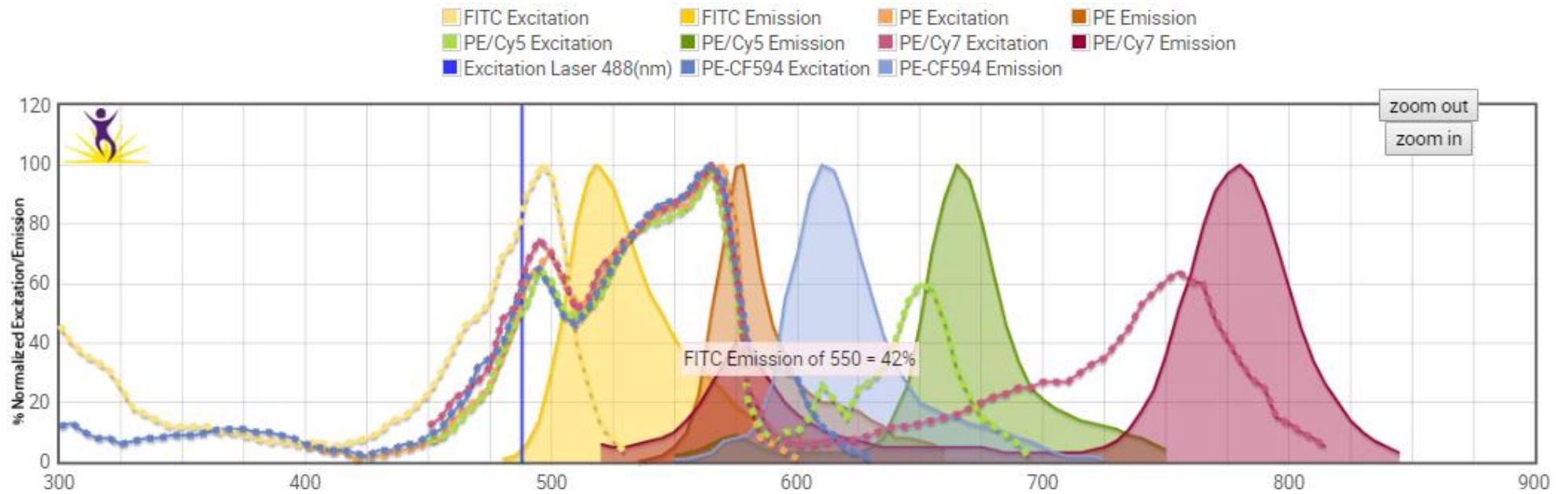
ESPECTROS DE FLUORESCENCIA DE LOS FLUOROCROMOS UTILIZADOS:

Láser azul de 405nm



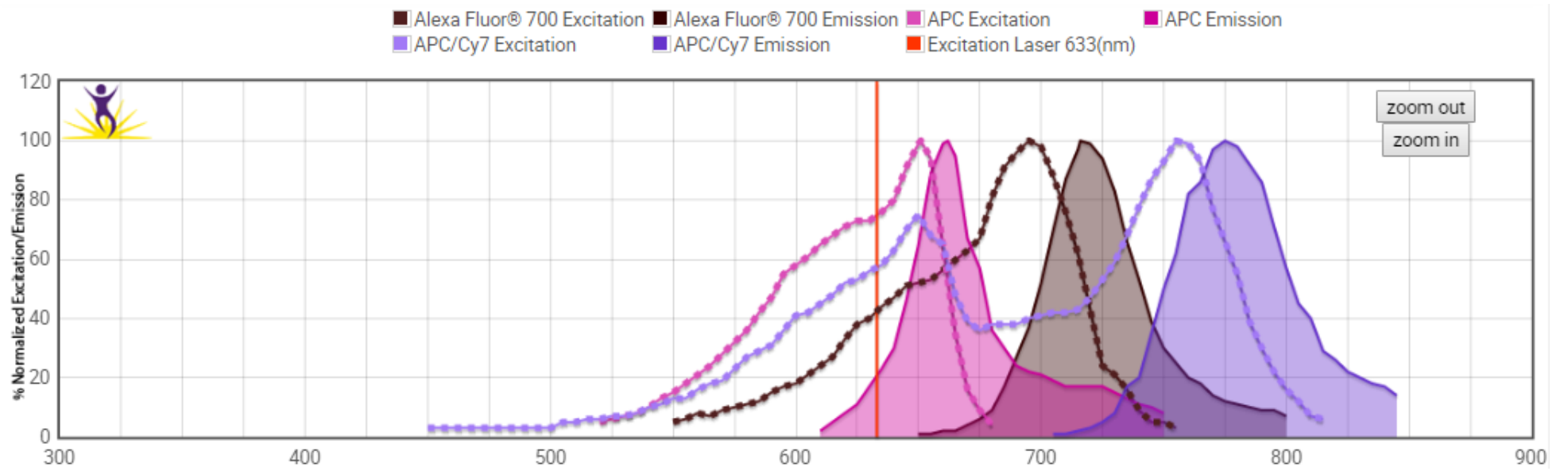
Fuente: <https://www.biolegend.com/>

Láser azul de 488nm



Fuente: <https://www.biolegend.com/>

Láser rojo de 633nm



Fuente: <https://www.biolegend.com/>

