



Universidad de Valladolid

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

“Efecto inmunoestimulador de las subpoblaciones de células dendríticas en la mucosa intestinal humana”

Autora: Carolina González de Castro

Tutores: David Bernardo Ordiz, José Antonio Garrote Adrados

MÁSTER EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

CURSO 2020-2021



A mis compañeros del C1 (Aida, Angel, Candi, Paloma, Virginia) por todo el apoyo y ayuda constante, pero sobretodo una compañía inmejorable e intensas aventuras. Gracias.

A mis compañeros del máster, especialmente por las visitas revitalizadoras durante las largas jornadas en el laboratorio.

A todos los profesores del máster por la paciencia y haberme enseñado asignaturas más allá de la Química. Especialmente a los profes de inmunología y citometría (y a Álvaro), sin los que no habría podido hacer este TFM.

Gracias a las Unidades digestivas del Hospital Clínico y Río Hortega de Valladolid.

Muchas gracias a David, que me ha enseñado mucho a lo largo de este proyecto, ofreciéndome una gran actividad formativa y un ambiente de trabajo inmejorable, siempre resolviendo las crisis sin dejar que cundiera el pánico.

Mi mayor agradecimiento ha de ser para Elisa, que no ha dudado en ser mi guía (literalmente) durante toda mi estancia en el IBGM, apoyarme en mis experimentos, echarle horas (y risas), y atenderme con paciencia infinita.

Índice

1. ABREVIATURAS	- 1 -
2. RESUMEN	- 2 -
3. INTRODUCCIÓN	- 3 -
I. EII y tipos	- 4 -
Colitis Ulcerosa	- 5 -
Enfermedad de Crohn.....	- 5 -
II. Células dendríticas	- 5 -
CD intestinales.....	- 6 -
Células dendríticas en EII	- 8 -
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	- 9 -
Hipótesis de trabajo	- 9 -
Objetivos principales	- 9 -
Objetivos específicos	- 9 -
5. MATERIAL Y MÉTODOS	- 10 -
I. Reactivos y soluciones empleadas	- 10 -
II. Material	- 11 -
III. Equipos y licencias	- 11 -
IV. Demografía y pacientes a estudio	- 11 -
V. Protocolo resecciones	- 12 -
VI. Enriquecimiento de subpoblaciones de CD intestinales	- 12 -
VII. Enriquecimiento de linfocitos T	- 14 -
VIII. Ensayo Inmunoestimulador - Cocultivo	- 15 -
IX. Análisis estadístico	- 16 -
6. RESULTADOS	- 17 -
7. DISCUSIÓN	- 24 -
8. CONCLUSIONES	- 26 -
9. BIBLIOGRAFÍA	- 27 -
10. ANEXOS	- 30 -

1. Abreviaturas

- **APC**, antigen presenting cells o **CPA** Células presentadoras de antígeno
- **CD**, células dendríticas
- **CDc**, células dendríticas convencionales
- **CMSP**, células mononucleares de sangre periférica o **PBMC**, Peripheral blood mononuclear cells
- **CU**, Colitis Ulcerosa
- **EC**, Enfermedad de Crohn
- **EII**, Enfermedad inflamatoria intestinal
- **GI**, gastrointestinal
- **LP**, lámina propia
- **LPL**, linfocitos de lámina propia
- **MO**, macrófagos
- **Th**; Células T helper
- **TLR**, toll-like receptors

2. Resumen

En el presente trabajo hemos estudiado la capacidad estimuladora y el fenotipo que las diferentes subpoblaciones de células dendríticas del intestino humano inducen sobre los linfocitos T naïve. Para tal fin, hemos comparado no sólo las células dendríticas del colon e íleon de controles no afectados, sino también de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal para tratar de encontrar nuevos mecanismos que faciliten el desarrollo de innovadoras terapias contra estas enfermedades.

En cuanto al procedimiento experimental, se ha conseguido con éxito el aislamiento de diversas subpoblaciones de células dendríticas que se mantenían viables y con capacidad estimuladora, partiendo tanto de resecciones de controles sin enfermedad inflamatoria intestinal (EII) como de pacientes con EII activa, para estimular linfocitos T naïve, y corroborar el fenotipo que estos adquieren.

Los ensayos de inmuoestimulación han resultado un éxito en cuanto a la técnica empleada, obteniéndose resultados con diferencias significativas que permiten extraer conclusiones relativas a la estimulación diferencial entre subpoblaciones de células dendríticas.

Palabras clave: *Células dendríticas · Enfermedad Inflamatoria intestinal · Enfermedad de Crohn · Mucosa intestinal · Citometría de flujo*

Abstract

In the present work we have studied the phenotype and stimulatory capacity that the different subsets of human intestinal dendritic cells elicit on naïve T lymphocytes. To this end, we have compared not only ileal and colonic dendritic cells from controls, but also of patients with inflammatory bowel disease aiming to find new mechanisms that could be of help in the development of innovative therapies against these diseases.

As for the experimental procedure, the isolation of several dendritic cell subsets was successfully achieved, as they remained viable and with stimulatory capacity following their enrichment from the intestinal mucosa from controls and active patients with inflammatory bowel disease (IBD) as proved by the stimulation induced on naïve T-cells.

The technique used for the immunostimulation assays were successful, obtaining significant results that allow to draw conclusions regarding the differential stimulation between human intestinal dendritic cell subsets.

Key words: *Dendritic cells · Inflammatory Bowel Disease · Crohn's Disease · Intestinal Mucosa · Flow Cytometry*

3. Introducción

La **enfermedad inflamatoria intestinal (EII)**, en la que se incluyen la enfermedad de Crohn (EC) y la Colitis ulcerosa (CU), es una patología crónica mediada por el sistema inmune que resulta en inflamación del tracto gastrointestinal (GI). Constituye un importante problema de salud, con impacto económico elevado, con una prevalencia estimada en torno al 0,6-0,8% de la población en países occidentales^(1,2). Representa un serio problema de salud, afectando a más de 2,2 y 1,6 millones de habitantes en Europa y EEUU respectivamente⁽³⁾, de gran impacto socioeconómico principalmente por la ausencia de una cura, siendo comparable con enfermedades como la diabetes.

Los tratamientos actuales se basan en dosis crecientes de fármacos que conllevan importantes efectos secundarios, además de intervenciones quirúrgicas frecuentes y recurrentes⁽²⁾, especialmente en los pacientes con EC. Por este motivo es necesario establecer nuevas inmunoterapias específicas que permitan tener el control de los procesos inflamatorios en los pacientes que sufren EII, de modo que en un futuro se pueda **eliminar esa necesidad de pasar por cirugía**.

Como primer obstáculo, y objetivo a corto plazo, se ha de **entender el funcionamiento del sistema inmune del tracto GI**, especialmente el mecanismo de las células dendríticas (**CD**) en la tolerancia intestinal. Esto es importante ya que las CD son las encargadas de mantener los mecanismos de la homeostasis intestinal en situación de no inflamación, así como las que inducen el desarrollo de una respuesta inmune activa en los pacientes con EII⁽²⁾.

El tejido intestinal está formado por una monocapa de células epiteliales especializadas en la absorción de nutrientes y agua, que además ejerce de barrera. En el epitelio se pueden encontrar principalmente células T, mientras que un número elevado de células del sistema inmune se puede encontrar en la lámina propia, bajo las células epiteliales, entre las cuales destaca las **CD** y los **macrófagos (MO)** (*Ilustración 1*), encargadas de orquestar el tipo de respuesta inmune (tolerogénica o pro-inflamatoria) que se establece frente a cada antígeno intestinal⁽²⁾.

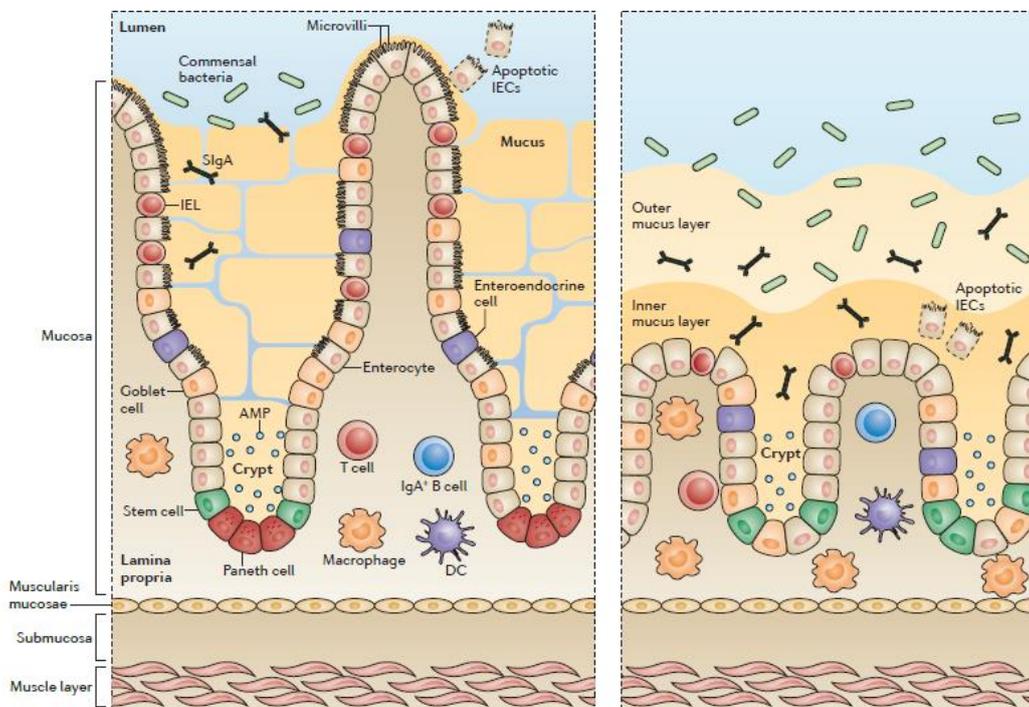


Ilustración 1⁽⁴⁾. Estructura de la mucosa intestinal a lo largo del tracto gastrointestinal, yeyuno (izquierda) y colon (derecha)

El tracto GI, es el órgano del cuerpo humano con mayor extensión, alcanzando la mucosa un área de 100 m²(2). Dado que se encuentra en continuo contacto con antígenos, tanto derivados de los nutrientes de la dieta como de la microbiota comensal, contiene el mayor número de células del sistema inmune del cuerpo humano(4). Para frenar la vulnerabilidad de la mucosa a sufrir infecciones y consecuentes procesos inflamatorios, el sistema inmune de este órgano ha de estar en continua vigilancia, estableciendo los mecanismos de tolerancia frente a aquellos antígenos inocuos y al mismo tiempo alertando de aquellos que supongan un peligro, activando los mecanismos de respuesta inmune(5-7).

La **homeostasis intestinal** constituye por tanto una parte fundamental del correcto funcionamiento del intestino, ejerciendo esa tolerancia o falta de respuesta frente a antígenos no perjudiciales que es crucial(8) para no desencadenar una respuesta exagerada frente a ellos, ya que esta puede derivar en diversas enfermedades inflamatorias(9), como sería el caso de la EC si se atacan antígenos de la microbiota o la enfermedad celiaca si la respuesta inmune es frente a derivados alimentarios. Este equilibrio de la inmunidad intestinal que se consigue es el claro ejemplo de cómo las señales inmunes innatas se integran constantemente para regular las respuestas inmunes adaptativas(8).

Ha de tenerse en cuenta que la influencia de factores ambientales altera las propiedades del sistema inmune de cada compartimento intestinal(4), lo cual por ejemplo concuerda con la mayor carga bacteriana presente en el colon respecto al íleon(6).

La interacción de las células presentadoras de antígeno (CPA) principalmente las CD y MO, con los linfocitos, es capaz de producir la diferenciación de estos últimos, haciendo que adquieran fenotipos con respecto al antígeno que ha sido presentado. La tolerancia central se encargará, mediante selección negativa, de eliminar aquellos linfocitos que sean autorreactivos mientras que otros se convertirán en lo que se conoce como linfocitos T naturales reguladores (natural T reg) por lo que se establece **una tolerancia periférica para los antígenos intestinales**(5).

Por otro lado, que la tolerancia oral a la microbiota esté altamente restringida al intestino tiene sentido, porque estos patógenos fuera de este ambiente serían altamente perjudiciales(8). La microbiota es capaz de modular la inmunidad intestinal, demostrándose incluso que algunos péptidos son capaces de restaurar la homeostasis en pacientes con EII en remisión(3) pudiendo ser perjudiciales en EII activa, no solo por su contacto directo sino gracias a mediadores solubles.

Se requieren muchos procesos celulares y moleculares escalonados para obtener una tolerancia oral estable y duradera, resultando en una regulación inmune correcta en el intestino. Los procesos involucrados son específicos del sistema inmunitario intestinal, constituyendo posibles dianas terapéuticas específicas de intestino que a menudo forman parte de tratamientos terapéuticos en enfermedades inmunitarias(5).

I. EII y tipos

No hay un conocimiento completo sobre la etiología de la EII, pero sí se sabe que entre los factores clave que influyen en la patogénesis están los factores genéticos(8), inmunológicos, alimentarios y ambientales(10), así como la función de la barrera intestinal y la respuesta inmune de la mucosa. Los pacientes con EII muestran menor diversidad de microbiota que los controles sanos, con mayores alteraciones en pacientes con EC que con UC(11).

La hipótesis más aceptada respecto a la patogénesis de la EII establece que la EII deriva de una respuesta anormal del sistema inmune hacia la microbiota comensal.

Los defectos en la barrera intestinal, especialmente en fase aguda, son clave en la enfermedad, y en remisión, aunque se aprecia cierta mejoría, no hay recuperación

completa. Esta alteración de la barrera permite la entrada de antígenos en los tejidos, haciendo que se genere una respuesta inmune activa frente a la microbiota intestinal. Está por determinar si la alteración de la barrera surge como consecuencia de la inflamación observada o si es un proceso independiente relacionado con la EII, ya que algunos estudios muestran como la alteración de la barrera desemboca en inflamación, mientras que hay casos de EII partiendo de barrera sin defectos⁽¹⁰⁾.

Sucesivos estudios han demostrado que las personas que sufren EII muestran alteraciones y perfil pro-inflamatorio en comparación con controles sanos, tanto en las CPA circulantes, como en las de la mucosa, presentándose tales alteraciones también en los precursores de las células⁽³⁾. Además en las fases agudas de la patología se observa una reducción de CD periféricas⁽¹²⁾. Es lógico que este tipo celular sea clave en EII, pues dirige el tipo de respuesta inmunitaria que se adopta ante un patógeno.

La diferencia entre la gravedad de las enfermedades inflamatorias intestinales puede tener relación con la cambiante actividad inmunológica que presenta el tracto GI⁽¹³⁾. Son muchas las citoquinas que están involucradas en el comienzo, progresión o desarrollo de la patogénesis de EII, perpetuando el daño tisular y los patrones de desequilibrio inmunológico⁽³⁾. Cada tipo de EII tiene además sus patrones de distribución y síntomas característicos⁽⁴⁾:

Colitis Ulcerosa

Esta patología se encuentra principalmente restringida al colon, con predilección por el recto y el colon distal. La distribución de esta patología es continua, y la inflamación se localiza principalmente en la mucosa y la submucosa.

Enfermedad de Crohn

Al contrario de la anterior, puede presentarse en cualquier parte del tracto GI, desde la boca hasta el ano, siendo el íleon la parte afectada más habitual. Se distribuye de una forma parcheada, y la inflamación habitualmente traspasa las paredes intestinales, dando lugar a fístulas o estenosis. Uno de los factores ambientales que más afecta a esta patología es el tabaco⁽¹⁴⁾, mostrándose asociado a diagnósticos en mayores de 40 años así como a estados más graves de la enfermedad⁽¹⁵⁾.

No existen asociaciones inequívocas sobre que microorganismos podrían condicionar la distribución de las enfermedades, aunque sí que se ha visto por ejemplo evidencias de distinta composición de microbioma para pacientes con colon o íleon afecto.

II. Células dendríticas

Para el actual abordaje de investigación **se estudiará la compartimentación inmunológica a lo largo del tracto GI**, sentando las bases para el desarrollo de métodos específicos de inmunoterapia que logren evitar los dañinos efectos colaterales de la inmunomodulación a nivel sistémico que se viene empleando. Para poder entender el funcionamiento del sistema inmune en el intestino hay que entender cómo son sus células, y en concreto para este proyecto nos interesan las CD, y como sus propiedades se ven alteradas en la EII.

Pese a ser identificadas en la década de 1970⁽¹⁶⁾, y posteriormente acuñadas como dendríticas, el campo de las CD no ha parado de crecer desde los 90⁽¹⁷⁾, y en las dos últimas décadas se ha afianzado el conocimiento del papel que desempeñan a la hora de mantener la integridad inmunológica, y la importancia que tienen en el desarrollo de ciertas enfermedades de carácter inmune, sugiriendo que son células imprescindibles para activar la respuesta de células T. Esto es debido a que las CD son las CPA más potentes que existen. Constituyen un grupo de células heterogéneo de origen hematopoyético⁽¹⁸⁾ que evolucionaron junto con el sistema inmune adaptativo⁽¹⁷⁾, y que por su capacidad presentadora de antígeno actúan de nexo entre la inmunidad innata y adaptativa⁽¹⁸⁾. Mantienen así el delicado equilibrio en el intestino entre la

inmunogenicidad contra patógenos invasores y la tolerancia de la microbiota comensal⁽¹⁹⁾.

Los precursores de las CD migran desde la médula ósea a la mayor parte de los tejidos del cuerpo, incluido la mucosa intestinal, convirtiéndose en centinelas y sensores del sistema inmune. Son capaces de identificar la naturaleza del antígeno que se encuentran, determinando si es peligroso o inocuo a través de los receptores reconocimiento de patrones, que incluyen entre otros a los TLR^(18,20).

Las CD primero se encuentran en un estado inmaduro, con poca capacidad para estimular células T pero tienen mecanismos de captación y procesamiento antigénico. Tras su maduración cambian el fenotipo, se trasladan a zonas de interacción celular, donde son capaces de estimular y determinar el tipo de respuesta inmune que se establece frente a cada antígeno (tolerogénica o pro-inflamatoria)^(20,21) a través de tres tipos de señales que serán captadas por los linfocitos T naïve y gracias a las cuales se diferenciarán de forma específica al antígeno presentado. Además son capaces de determinar la especificidad tisular, promoviendo la migración de las células T que activan para una mayor eficiencia de la respuesta inmune.

Se puede distinguir entre dos tipos de poblaciones de CD atendiendo a su fenotipo: plasmacitoides (pCD), CD11c⁻, y mieloides, clásicas o convencionales (CDc), CD11c⁺, siendo estas últimas las encargadas de mantener el equilibrio **entre tolerancia e inmunidad** en el intestino^(7,22,23).

Las CDc se pueden a su vez dividir en las de tipo 1 (CDc1), especializadas en presentación cruzada a los linfocitos T de fenotipo CD8⁺, y las de tipo 2 (CDc2), que presentan antígenos a los linfocitos T CD4⁺^(24,25). Mientras que las CDc1 son CD103⁺, las CDc2 expresan SIRPα. Sin embargo, en el intestino, gracias a su inmunología única, se puede diferenciar una subpoblación única de CDc2 que es **CD103⁺SIRPα⁺**.

De ahora en adelante los tres tipos de CD humanas sobre los que hablaremos serán **CD103⁺SIRPα⁻(CDc1)**, **CD103⁺SIRPα⁺ (CDc2 específicas de intestino)** y **CD103⁻SIRPα⁺(CDc2)**^(4,26). A pesar de compartir algunas de las propiedades con los modelos murinos, no todos los estudios son trasladables, aunque sí se conservan algunas de las propiedades que hacen a las CD del intestino únicas⁽²⁷⁾.

CD intestinales

Las células del sistema inmune en el intestino se encuentran mayoritariamente en la zona de la lámina propia, bajo la barrera epitelial. Entre ellas encontraremos CPA que se encargan de la captación de antígenos administrados por vía oral, como los MO y las CDc, confirmando esta zona como una de las de mayor carga y captación antigénica en el cuerpo humano⁽²²⁾. Son estas últimas, las CDc, las únicas capaces de producir respuestas inmunes primarias efectivas mediadas por células T naïve, gracias a que son únicas en su capacidad migratoria a los nódulos linfáticos, donde se produce esa activación linfocitaria que antes se mencionaba; son por tanto las responsables de desarrollar la función presentadora de antígeno y las que se encargan de mantener la tolerancia inmune frente a antígenos inocuos, pero al mismo tiempo responder a patógenos invasores.

Si bien es cierto que el sistema inmune sistémico favorece una respuesta inmune activa general frente a los antígenos foráneos, el de la mucosa intestinal tiene predisposición a la tolerancia de los mismos⁽²⁰⁾. Las CDc del tracto GI muestran un perfil tolerogénico, debido principalmente a la gran exposición a antígenos microbianos y de la dieta. Además se caracterizan como inmaduras en comparación con las que se encuentran en otros tejidos⁽²⁾, y es por eso que estimulan menos⁽²⁸⁾ y se han observado además diferencias cualitativas en la estimulación que realizan

las CDc del intestino en los linfocitos T con respecto a los estimulados con CDc de distintos tejidos⁽²²⁾.

Tal y como se ha ido descubriendo, la lámina propia contiene subpoblaciones inusuales de CDc que son cruciales a la hora de inducir la tolerancia a los antígenos intestinales. Estas subpoblaciones son muy dinámicas, y las células entran y salen del compartimento intestinal continuamente⁽²³⁾. Dado el importante papel de las CDc en el intestino, es importante caracterizarlas^(8,22), y para que la caracterización sea correcta se han de usar sucesivas aproximaciones, si bien es cierto que en ocasiones que los distintos grupos de investigación usan diferentes marcadores, dificultando la comparación de los datos.

Las diferentes subpoblaciones intestinales de CDc se clasifican por ontogenia, función y origen, en CD103⁺SIRPα⁻(CDc1), CD103⁺SIRPα⁺ (CDc2 específicas de intestino) y CD103⁻SIRPα⁺(CDc2), mas se desconoce qué subpoblación es la que genera linfocitos T reguladores o pro-inflamatorios, tanto en controles que no presentan inflamación como en pacientes con EII activa.

La subpoblación CD103⁺, que supone el 2-3% del total de leucocitos en la lámina propia del intestino de un ratón⁽¹⁹⁾, está en conjunto especializada para generar una función reguladora⁽¹³⁾, ya que es única en su capacidad para generar linfocitos T reguladores (Treg) inmunosupresores FOXP3⁺^(29,30) además de ser capaces de inducir la expresión de moléculas de migración al intestino en los linfocitos que han estimulado⁽²⁷⁾. La población concreta CDc2 CD103⁺ es fundamental en los procesos de homeostasis intestinal⁽³¹⁾.

La información acerca de las CDc del intestino es escasa, si bien son menos los estudios que distinguen entre las propiedades que tienen las células inmunes en diferentes regiones del intestino^(2,6). Estas propiedades tan particulares que muestran las subpoblaciones de CDc CD103⁺ no las muestran las CDc de otros tejidos⁽¹⁹⁾, y esto podría deberse o bien a que haya precursores específicos de intestino, o más probablemente al microambiente que las rodea^(23,27), que determina la función dendrítica.

La microbiota comensal puede influenciar estas variaciones⁽⁴⁾, se determinó en 2016⁽⁶⁾ por primera vez las diferencias funcionales entre los compartimentos, sin cambios por ejemplo en CD103⁻SIRPα⁺, pero con mayor proporción de CD103⁺SIRPα⁻ en colon, y con la observación de que hay menos células dendríticas CD103⁺SIRPα⁺ en el colon que en el íleon, pero estas tienen más actividad inmunológica y un fenotipo más maduro, siendo más capaces de generar células Treg^(6,13), en concreto las de tipo CD4⁺FoxP3⁺IL10⁺ Treg. Realmente estas diferencias entre colon e íleon, y la capacidad aumentada de regulación del colon, no se tienen porque deber a cambios en la composición de dendríticas, sino a diferencias intrínsecas de CD103⁺SIRPα⁺ y CD103⁺SIRPα⁻⁽⁶⁾, a esa adaptación que tiene que sufrir el intestino a la gran carga bacteriana que soporta.

Tal y como varían la composición de CDc, es de esperar que las propiedades del sistema inmune varíen a lo largo del tracto GI^(4,32). Estos hallazgos han de tenerse en cuenta a la hora de realizar estudios diferenciales, sobre todo como nuevas dianas de inmunoterapia. A pesar de que en el presente trabajo no se entra a valorar el papel de los MO intestinales, para sucesivos trabajos se ha de tener en cuenta su actividad fagocítica y capacidad moduladora de respuestas de las células T, así como su papel en EII⁽²⁾.

Las CDc del intestino producen de forma constitutiva IL-10 y mantienen la tolerancia inmune en el intestino generando y manteniendo las respuestas de las células Treg dirigidas contra antígenos de la dieta y de la bacteria comensal. Los antígenos

intestinales favorecen la generación de linfocitos Tregs inducidos, además de facilitar la obtención de una 'pool' de Treg en el intestino⁽⁵⁾.

Si las CDc CD103⁺ tienen un papel crucial en la tolerancia oral, y además generan Treg, debe existir un vínculo entre ambos⁽⁵⁾. La subpoblación Treg FOXP3⁺ puede provenir de interacciones en el timo, natural Treg (estables in vivo), o por la diferenciación de células T CD4⁺ en el sistema inmune periférico, Treg inducidas⁽³³⁾, estas últimas debido a su plasticidad se pueden transformar en otras células Th si se dan las condiciones inflamatorias adecuadas. El poder que ejercen las FOXP3⁺ Treg sobre la tolerancia oral ha quedado demostrado por diversos estudios, observándose además que a mayor dosis de antígeno ingerido, mejor se produce la inducción de estas células⁽⁸⁾.

Células dendríticas en EII

En el intestino hay que prestar especial atención al equilibrio entre la tolerancia a la flora comensal y los nutrientes, y la inmunidad frente a patógenos invasores, y este equilibrio corre a cargo de las células dendríticas. Los controles sanos son capaces de conservarlo, pero si este delicado equilibrio se ve alterado, se observa la progresión de EII^(34,35).

Los pacientes con **EII presentan CDc con un elevado perfil pro-inflamatorio**, durante periodos activos de la enfermedad, y tienen capacidad reducida para generar linfocitos Treg, en contraposición al intestino humano sano que presenta perfil tolerogénico para mantener el equilibrio intestinal^(36,37). Por ejemplo, en CU se observa que las CDc tienen un fenotipo inmaduro⁽³⁸⁾ en comparación con los controles sanos.

Las CDc del tejido inflamado de pacientes con EII tienen más expresión de receptores de reconocimiento de patrones, como TLR, y por tanto más probabilidad de tener una respuesta exacerbada que en el tejido no afecto y el de controles sanos^(35,39). De esta manera han perdido su perfil tolerogénico y son más pro-inflamatorias, la estimulación se decanta menos por la producción de Treg pero más hacia Th1 y Th17⁽³⁴⁾.

Sin embargo, y aunque las CDc sean imprescindibles a la hora de empezar con el proceso inflamatorio en los pacientes EC, **no se conoce cuál es la subpoblación específica responsable de la desregulación** del sistema inmune.

4. Hipótesis y objetivos

A través de este trabajo de fin de máster se ha intentado ahondar en los siguientes aspectos:

Hipótesis de trabajo

A lo largo del tracto gastrointestinal existe variación en la composición de las subpoblaciones de CDc. Dado que estas células están especializadas en diferenciar a distintos tipos de linfocitos T efectores, asumimos que el tipo de linfocitos T generados variará en función del compartimento de estudio y también en patologías con alteraciones inflamatorias, como EC.

Objetivos principales

- Profundizar en mecanismos inmunológicos que subyacen a la diferenciación de los linfocitos T naïve en linfocitos T efectores en la mucosa intestinal humana, tanto de tejido EC como no inflamado.
- Determinar la función de las subpoblaciones de CDc intestinales.

Objetivos específicos

- Enriquecimiento de subpoblaciones de CDc de lámina propia de controles y de pacientes con EC, mediante citometría tipo sorting.
- Caracterización de la función de las subpoblaciones de CDc del intestino humano.
- Aislar y purificar Linfocitos T naïve desde células mononucleares de muestras de sangre periférica (CMSP) con beads magnéticas.
- Evaluar la capacidad inmunoestimuladora de las CDc de la lámina propia, LP, sobre los linfocitos T naïve.
- Determinar si existen diferencias funcionales en las subpoblaciones de CDc con respecto al tejido estudiado (colon vs íleon) tanto de controles no inflamados como en el tejido afecto de EC.
- Evaluar las posibles alteraciones mecánicas entre controles no inflamados y pacientes con EC para identificar las subpoblaciones de CDc que inducen la diferenciación a linfocitos T pro-inflamatorios en la EII en general, y en la EC en particular.
- Estudiar si las subpoblaciones de CDc de tejido no afecto de personas con EC está alterado funcionalmente con respecto a los controles.
- Identificar cuáles son las poblaciones de CDc en el tejido inflamado de pacientes con EII que promueven el desarrollo de linfocitos T pro-inflamatorios y bloquean los reguladores.

5. Material y métodos

I. Reactivos y soluciones empleadas

Reactivo	Marca	Concentración stock
RPMI: Medio completo de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI Medium1640)	Gibco	1x
AIM-V®: Serum Free medium	Gibco	1x
HBSS: Hank's Balanced Salt Solution	Gibco	1x
DTT: Dilitreititol	Sigma-Aldrich	Sólido
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético disódico	Sigma-Aldrich	Sólido
Colagenasa D	Roche	Sólido
Liberasa TL Research Grade	Sigma-Aldrich	Sólido
Benzonasa: Nucleasa universal Pierce para lisis celular	Thermo Scientific	250 kU/ml
FBS: Suero fetal bovino	Gibco	
DMSO: Dimetilsulfóxido	MP Biomedicals	
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Cytiva Hyclone	
Azida Sódica	Sigma-Aldrich	Sólido
Kit de Fijación y Permeabilización intracelular	Life Technologies	
Paraformaldehído	Protocol	10%
Bovine Serum Albumin (BSA) Fraction V Ig free	Gibco	Sólido
Pan T Cell Isolation Kit human	Miltenyi Biotec	
REAl ease® CD62L MicroBead Kit human	Miltenyi Biotec	
Human BD FcBlock	BD Biosciences	0,5 mg/ml
Cell Trace™ Violet stain	Invitrogen	
Fitohe maglutinina (PHA)	Sigma	1mg/ml

Solución	Concentración de uso
Alícuotas EDTA	Disolución de 1,86gr de EDTA en 100ml H ₂ O miliQ. Se esteriliza por filtración y se conserva a 4°C. Concentración 0,05 M.
Alícuotas DTT	Disolución de 1gr DTT en 65ml H ₂ O miliQ. Se esteriliza por filtración y se conserva a -20°C. La concentración final es de 0,1 M.
HBSS con DTT/EDTA	HBSS con DTT 1 mM y EDTA 0,5mM, partiendo de las alícuotas anteriores
Alícuotas Colagenasa	Alícuotas de concentración 10 mg/ml en RPMI y conservar a -20°C.
Alícuotas Liberasa	Alícuotas de concentración 0,2 mg/ml en RPMI y conservar a -20°C.
Colagenasa-Liberasa-Benzonasa	25 u/ml Benzonasa + 1 mg/ml Colagenasa + 0,02 mg/ml Liberasa en RPMI
Medio de congelación	90% FBS + 10% DMSO
FACS-Buffer: Fluorescence Activated Cells Sorting Buffer	2% FBS +3mM NaN ₃ + 1 mM EDTA en DPBS
Paraformaldehído	Al 2% en FACS
MACS Buffer	2 mM EDTA + 0,5% BSA en PBS
Cell Trace	Para preparar cada vial de uso se le añade 20 µl DMSO, siguiendo indicaciones del fabricante

II. Material

Material	Marca
Pipetas Pasteur	Fisherbrand
Micropipetas	Gilson
Tubos Falcon-15 mL	Corning
Tubos Falcon-50 mL	Corning
Tubos citometría 5 mL polipropileno	Falcon-A Coming Brand
Tubos citometría 5 mL poliestireno cell strainer cap	Falcon-A Coming Brand
Placa Petri 96 pocillos	Corning
Columnas LS y MS	Miltenyi biotec
Imán	Quadro MACS Miltenyi biotec
Filtros de 100 µm y 70 µm	Fisherbrand
Crioviales	Fisherbrand

III. Equipos y licencias

- Agitador Vortex · Heidolph Reax Top
- Centrífuga GT 2R · Fisher Brand
- Centrífuga 5424 R · Eppendorf
- Agitador-Incubador Shaker MaxQ 4450 · Thermo Scientific
- Citómetro Gallios · Beckman Coulter con tres láseres: 405 nm,408 nm,638 nm y 10 detectores
- Citómetro sorter FACS Aria · BD Biosciences con tres láseres: 405 nm,408 nm,638 nm y 9 detectores
- Software Flow Jo v. 10.5.3
- Software GraphPad prism 9.1.2 Windows 64-bit

IV. Demografía y pacientes a estudio.

Las muestras de las resecciones ileocolónicas fueron recolectadas del Servicio de Cirugía General y de Aparato Digestivo del Hospital Clínico Universitario y del Hospital Universitario Río Hortega (ambos en Valladolid) previa obtención del consentimiento informado por parte de los pacientes (código de aprobación por parte del CEIm de Valladolid Este: 19-1353). Las resecciones se conservaron en HBSS en hielo y se procesaron a continuación.

Las muestras pertenecen a 2 grupos a estudio: i) pacientes con cáncer de colon proximal, a los que se les extrae una muestra de tejido de los bordes sanos (distancia mínima de 10cm al tumor) de la resección y que constituirá el grupo control; y ii) pacientes con enfermedad de Crohn (EC) con afectación ileocolónica. En este caso, se obtienen los bordes proximal (íleon) y distal (colon) no inflamado (distancia mínima a la lesión de 10cm), así como el tejido inflamado que puede ser de colon, íleon, o de ambos tejidos. De todos los participantes se obtuvieron los datos demográficos correspondientes (sexo, edad y etnia). En los pacientes con EC también se registró las características de la enfermedad en base a la clasificación de Montreal incluyendo edad de diagnóstico (A1< 16 años; A2: entre 17 y 40 años; A3> 40 años), localización (L1: ileal; L2: colónica; L3: ileocolónica; L4: tracto digestivo superior) y patrón evolutivo (B1: no obstructivo y no fistulizante -inflamatorio-; B2: obstructivo; B3: fistulizante; perianal) así como otros hábitos, como el tabaco, que pudieran afectar a los resultados.

En cuanto a las muestras de sangre periférica, se obtuvieron a partir de “buffy coats” proporcionados por el Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León (Valladolid). Las muestras fueron procesadas siguiendo el protocolo de gradiente de ficoll. Todas las muestras utilizadas provenían de pacientes jóvenes (<30 años).

V. Protocolo resecciones

Tras ser recogidas las resecciones se procesaron siguiendo protocolos optimizados (13,35,40). Las muestras se limpiaron con solución HBSS y con bisturíes estériles se separaron las zonas de interés de la muestra, eliminando grasa, músculo y las grapas de la resección en caso de que las hubiese.

La sección de tejido a estudiar se fragmentó y se sometió a digestión con 5 ml de solución HBSS con DTT/EDTA, en dos incubaciones con agitación consecutivas (30 minutos, 37°C, 250 rpm). Con este paso se elimina el mucus y la barrera epitelial, por lo que tras cada incubación se filtró (con una malla de 100 µm) para recuperar los linfocitos intraepiteliales (IELs) que se encuentran en el sobrenadante.

Tras este proceso, las muestras se disgregaron enzimáticamente, facilitando la máxima extracción de células. En un nuevo tubo de 15 mL se puso la muestra con 4-5 ml de solución C/L/B. A continuación, se sometieron las muestras a tres incubaciones de 30 minutos con agitación (37°C, 250 rpm). Al igual que antes entre cada una de las incubaciones se filtró, guardando el sobrenadante, en el que se hallan las células **mononucleares de la lámina propia, LPL**.

Los sobrenadantes recogidos se centrifugaron (300 g, 10 min, 4°C), se resuspendieron en RPMI y pueden ser utilizados en el momento o, como es este caso, congelados a -80°C para experimentos posteriores en medio de congelación.

VI. Enriquecimiento de subpoblaciones de CD intestinales

Cuando se realizó cada experimento se tomaron los viales de células de lámina propia congeladas, descongelando rápidamente previo a realizar la tinción, en esterilidad, para el enriquecimiento de las células mediante citometría de flujo tipo sorting, utilizando un protocolo optimizado y en uso^(6,13). Antes de comenzar se filtraron las muestras con los tubos de citometría correspondientes, eliminando posibles impurezas.

Han sido previamente tituladas las correspondientes diluciones para todas las tinciones, y están optimizadas para menos de 10^7 células por tubo.

A continuación, las células de la lámina propia se tiñeron con anticuerpos monoclonales de citometría. La tinción comenzó con el marcador de viabilidad en dilución 1/2000 en FACS buffer, que penetra en aquellas células que no estén vivas. Se usó posteriormente el bloqueador de la fracción C de las inmunoglobulinas, FcBlock, para evitar señales inespecíficas con el resto de los anticuerpos empleados, en una concentración 1:50 en FACS buffer (Incubación 10 minutos, temperatura ambiente, oscuridad).

Para cada tubo de células se usaron 100 µl de mix de anticuerpo, en el que cada uno de los anticuerpos indicados en el panel (*Tabla 1*) está en la dilución oportuna en FACS buffer (Incubación 20 minutos, 4°C, oscuridad).

El abordaje en el citómetro tipo sorting (*Figura 1a*) comenzó descartando los dobletes (Enfrentando FS-H y FS-A se toma aquellas de la diagonal, ya que guardan una relación área-altura concreta, es decir, son singletes y se identifican por tamaño y complejidad). Dentro de las células que cumplen con este criterio se escogieron las que son viables y CD45⁺, correspondiente a leucocitos. La subpoblación CD14⁺CD64⁺ son los MO que van a servir como población celular control. Dentro de la fracción CD14⁻CD64⁻ las CDc se identificaron como HLA-DR⁺CD11c⁺ y se dividieron en subpoblaciones en función de la expresión de SIRPα y CD103: Población CDc2 CD103⁻ SIRPα⁺; Población CDc2 específica de intestino CD103⁺SIRPα⁺; Población CDc1 CD103⁺SIRPα⁻. La pureza del enriquecimiento llevado a cabo se puede observar en uno de los experimentos, recogido en la *Figura 1b*.

Las células ya separadas se conservaron en medio de cultivo AIM-V hasta que se procedió al ensayo de estimulación de los linfocitos T heterólogos.

Tabla 1. Panel de tinción para enriquecimiento de linfocitos de lámina propia, LPL.

Conjugado	Especificidad del anticuerpo	Dilución	Huésped/Clon/Isotipo	Casa comercial
FITC	CD45	1/800	Ratón/HI30/IgG1	Biolegend
PECF594	CD14	1/50	Ratón/MoP9/IgG2b,k	BD
PerCP/Cy5.5	CD64	1/50	Ratón/10.1/IgG1,k	Biolegend
Pe/Cy7	SIRP α	1/100	Ratón/SE5A5/IgG1	Biolegend
APC	CD11c	1/50	Ratón/Bu15/IgG1	Biolegend
APC Cy7	Live/Dead Near- IR fluorescent reactive dye	1/2000		Thermo Fischer Scientific
BV421	CD103	1/200	Ratón/Ber-ACT8/IgG1,k	Biolegend
BV510	HLA-DR	1/200	Ratón/L243/IgG2a,k	Biolegend

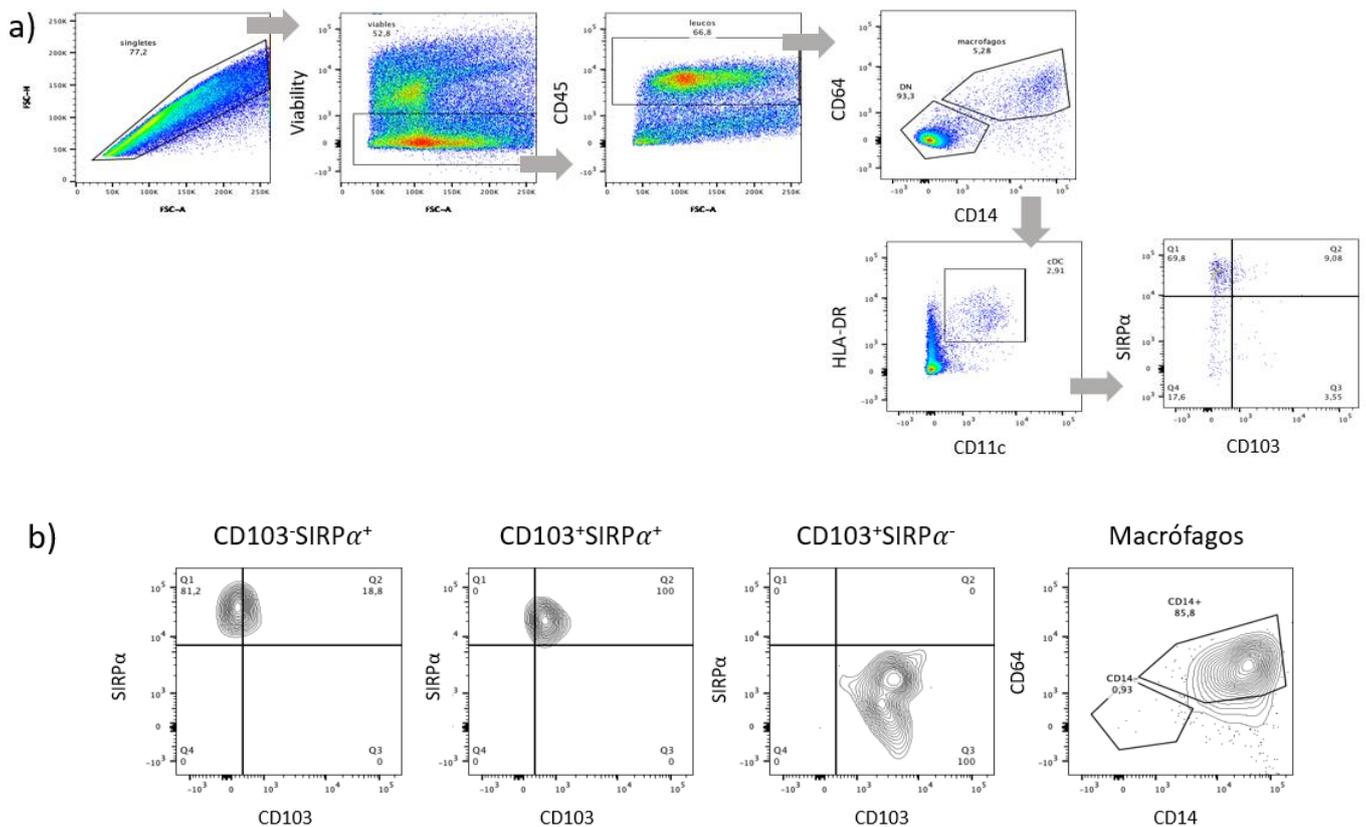


Figura 1. Enriquecimiento de subpoblaciones de células dendríticas desde la lámina propia. Las subpoblaciones de células dendríticas convencionales (CDc) y macrófagos fueron enriquecidas desde la lámina propia del intestino mediante abordaje de “flow sorting”. a) Las CDc se identificaron en el sorter dentro de la fracción singlete, viable, leucocitaria (CD45⁺) y no macrófago (CD14⁻CD64⁻) como células HLA-DR⁺CD11c⁺. Posteriormente, se dividieron en poblaciones en base a expresión CD103 y SIRP α . Los macrófagos (CD14⁺CD64⁺) se enriquecieron como control negativo de proliferación. b) Las células se adquirieron posteriormente en el sorter para confirmar la pureza del enriquecimiento.

VII. Enriquecimiento de linfocitos T

Para seguir el modelo de estimulación heterólogo, se emplearon linfocitos T que se obtuvieron desde sangre periférica, derivados de controles sanos. Las CDc son las únicas con capacidad para estimular linfocitos T CD4⁺ naïve, motivo por el que se enriquecieron para confirmar que las CDc que habíamos enriquecido eran realmente CDc y que eran funcionales.

Para obtener los linfocitos T, primero se procedió al enriquecimiento de células, en el que se separaron los linfocitos T totales del conjunto de células periféricas de la sangre usando Beads magnéticas, proveídas por Pan T Cell Isolation Kit human, que atrapan a las células gracias a su especificidad. Se hicieron pasar las células marcadas por una columna LS, acoplada a un imán, y únicamente quedaron retenidas en la malla de la columna, previamente acondicionada con tampón MACS, todas aquellas células que no nos interesan, eluyendo aquellas que sí. Por tanto, el aislamiento de las células T purificadas se consigue mediante eliminación magnética de células marcadas.

A partir de estas células se pueden obtener subpoblaciones específicas de células T, como por ejemplo las células T naïve CD4⁺(41) que son objeto de interés en este proyecto. Partiendo de los linfocitos T enriquecidos, se emplea el REAlease® CD62L MicroBead, con el cual quedan retenidas en la columna las células CD62L⁺. Al ser estas las células de interés, el kit también cuenta con tampón que permite liberar estas células.

Para comprobar que se realizó correctamente la purificación se optimizó un panel (*Tabla 2*) con el que teñimos células obtenidas de diferentes partes del proceso: PMBC iniciales (input), T totales, T de memoria, y las T naïve finales(output). En la *Figura 2a* se observa la estrategia seguida para identificar los linfocitos CD3⁺ viables, y las subpoblaciones en base a CD45RA/CD62L. La purificación de la subpoblación buscada se hizo por tanto mediante selección negativa en base a los marcadores de expresión de nuestras células de interés. Partiendo de un 30% de células T naïve CD62L⁺CD45RA⁺ (*Figura 2b*) se obtuvieron purezas del 70%, como se ve en la *Figura 2c*.

Tabla 2. Panel comprobación enriquecimiento T naïve.

Conjugado	Especificidad del anticuerpo	Dilución	Huésped/Clon/Isotipo	Casa comercial
PeCy5	CD3	1/100	Ratón/HIT3a/IgG2a,k	Biologend
APC	CD8	1/100	Ratón/RPA-T8/IgG1, κ	BD Pharmigen
FITC	CD4	1/100	Mouse/OKT4/IgG2b,k	Biologend
BV510	CD62L	1/100	Mouse/DREG-56/IgG1,k	Biologend
PeCy7	CD45RA	1/100	Mouse/HI100/IgG2b,k	eBioscience
APC Cy7	Live/Dead Near- IR fluorescent reactive dye	1/2000		Thermo Fischer Scientific

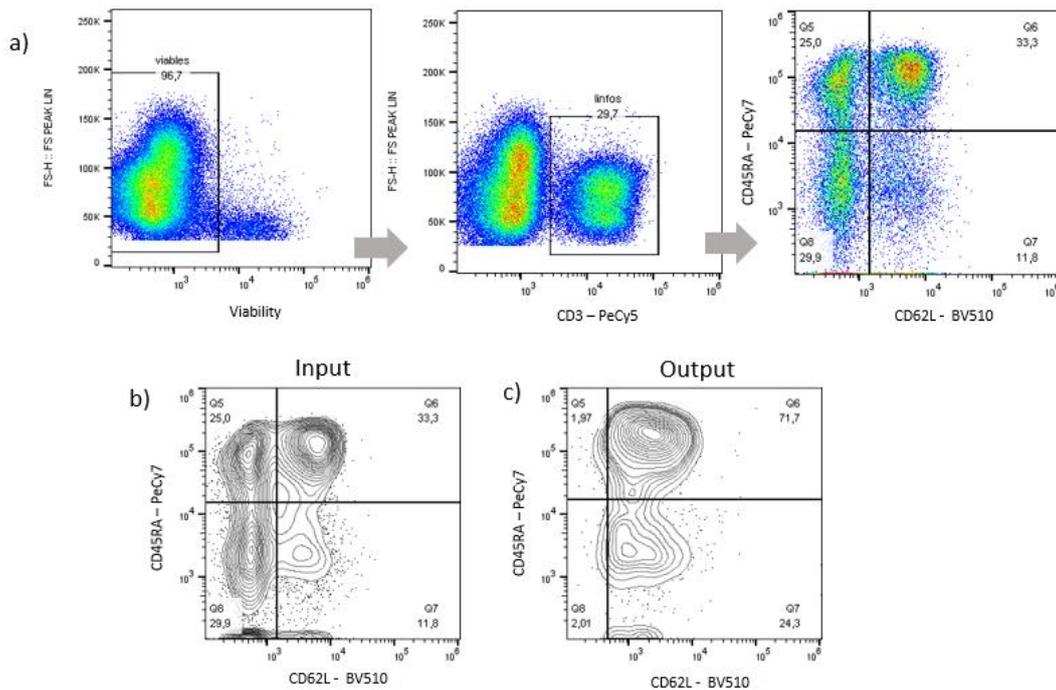


Figura 2. Enriquecimiento de las células T totales y posterior purificación de las T-naïve desde células mononucleares de sangre periférica. Con este abordaje de citometría se ha comprobado la purificación que se obtiene con la separación por Beads Magnéticas a) Se muestra la estrategia de identificación seguida para los linfocitos ($CD3^+$) viables y posteriormente las subpoblaciones, siendo subpoblación T naïve buscada $CD62L^+CD45RA^+$. Se muestra un ejemplo representativo de la b) distribución de subpoblaciones de células en el conjunto inicial, -input- y la c) distribución de subpoblaciones de células tras enriquecimiento y purificación, -output-.

VIII. Ensayo Inmunoestimulador - Cocultivo

La función que tienen las diversas subpoblaciones de CDc enriquecidas de cada una de las cohortes, controles y pacientes con EC, se procedió a evaluar por la estimulación sobre los linfocitos T naïve heterólogos. Aunque sería ideal el uso de linfocitos autólogos, estos presentan alteraciones que podrían afectar en el desarrollo de los experimentos, por lo que, para estudiar la función de las CDc del intestino, se enriquecieron las 3 poblaciones, además de los MO como control, para estimular en paralelo linfocitos T naïve heterólogos, lo que permite aplicar una estadística pareada.

Previo al cultivo, las células T naïve se tiñeron con el marcador de proliferación Cell Trace Violet. Por cada 10^6 células se tiñeron con Cell Trace en dilución 1/2000 en PBS. Se incubaron 20 minutos (temperatura ambiente, oscuridad) y luego se añadieron 5 ml de medio AIM-V y se incubaron, para acabar centrifugando (5 minutos, $300g, 4^{\circ}C$).

Cada subpoblación de CDc se utilizó para estimular a los linfocitos T en una proporción de 5%-95% respectivamente tras haber realizado ensayos previos de optimización de las densidades (datos no mostrados). El cocultivo se realizó durante 5 días en medio AIM-V, en incubador de $5\%CO_2$ a $37^{\circ}C$. Una vez finalizado ese periodo, se procedió a la tinción con un panel de citometría de 10 marcadores (Tabla 3).

En primer lugar se tiñeron con el marcador de viabilidad en dilución 1/2000 en FACS, tras el cual se bloquearon con FcBlock en la misma concentración detallada antes 1:50 en FACS buffer (Incubación 10 minutos, temperatura ambiente, oscuridad). Por cada tubo de células se usaron 100 μ l de mix de anticuerpos extracelulares, CD3 y CD4, en la dilución oportuna en FACS buffer (Incubación 20 minutos, $4^{\circ}C$, oscuridad).

Al realizar también una tinción intracelular es necesario el uso de reactivo que permite la fijación celular (Incubación 15 minutos, temperatura ambiente, oscuridad). Consecutivamente una nueva mix de 100 µl, pero en esta ocasión con los anticuerpos intracelulares que son aquellos restantes del panel, en una solución de un reactivo que permite, tras haber fijado la célula, abrir poros en la membrana para que los anticuerpos puedan entrar al citoplasma (Incubación 20 minutos, temperatura ambiente, oscuridad). Las células fueron posteriormente lavadas y fijadas durante 10 minutos (4°C, oscuridad) con paraformaldehído al 2%, de esta forma evitamos posibles degradaciones celulares y se homogenizan las medidas de fluorescencia. Finalmente, las células se vuelven a lavar con FACS buffer previo a su adquisición en el citómetro en un plazo máximo de una semana.

Para identificar las células tras su paso por el citómetro, primero se debe seleccionar aquellas que no son dobletes, tomando la diagonal de la gráfica cuando se enfrenta la altura y el área. Además, se deben tomar los viables CD3, linfocitos T viables (*Figura 3a*). Esto permitió evaluar por tanto la capacidad inmunoestimuladora que tienen las tres subpoblaciones de CDc sobre los linfocitos T naïve heterólogos así como en presencia de MO (control negativo de estimulación), visualizando la proliferación en la dilución de Cell Trace, y el perfil de diferenciación que adquieren estos linfocitos que responden a la estimulación, gracias a la tinción intracelular que indica el nivel de expresión de los marcadores de células (Th1: T-bet/IFN ; Th17: ROR.T/IL-17A; Treg: FoxP3/IL-10).

En todos los cultivos se incluyó como control negativo de proliferación linfocitos T naïve sin ningún estímulo, así como un control positivo de linfocitos con PHA. Esto permitió que a pesar de realizar un cocultivo heterólogo la estadística podrá ser pareada en base al perfil de linfocitos T diferenciados en el cultivo.

Tabla 3. Panel de citometría de tinción de las células tras el ensayo inmunoestimulador

Conjugado	Especificidad del anticuerpo	Dilución	Huésped/Clon/Isotipo	Casa comercial
FITC	FOXP3	1/50	Rat/PCH101/IgG2a,k	eBioscience
PE	ROR y T	1/50	Mouse/Q21-559/IgG2a,k	eBioscience
PEDazzle 594	IL-10	1/50	Rat/JES3-9D7/IgG1,k	Biologend
PeCy5	CD3	1/100	Mouse/HIT3a/IgG2a,k	Biologend
PeCy7	T-Bet	1/50	Mouse/4B10/IgG1,k	Biologend
APC	IFN γ	1/50	Mouse/4SB4/IgG1,k	Biologend
Alexa700	Viability Zombie NIR™	1/2000		Biologend
APC Cy7	IL-17a	1/50	Mouse/BL168/IgG1,k	Biologend
BV421	Cell Trace Violet™	1/2000		Thermofisher
BV510	CD4	1/200	Mouse/SK3/BALB/c IgG1	BD

IX. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados empleando GraphPad Prism 9.1.2 software para Windows (San Diego,CA,USA) . Los análisis y significación se detallan en la leyenda de cada figura.

6. Resultados

En primer lugar, lo que hicimos fue validar que la técnica empleada estaba funcionando correctamente. Para ello, se cultivaron en un ensayo de inmunomodulación los linfocitos T naïve purificados con las 3 subpoblaciones de CDc y macrófagos obtenidos de un control sano. En la *Figura 3a* se muestra la estrategia de identificación de los linfocitos T CD3⁺ mediante citometría de flujo tras los 5 días de cocultivo. Todos los experimentos incluyeron un control negativo (es decir, linfocitos sin estimular) así como un control de estimulación (es decir, linfocitos que han sido estimulados con fitohematoglutina 1 µg/ml), de los cuales podemos observar la proliferación de CD4⁺ en la *Figura 3b*. Este es el tipo de linfocitos que, como veremos más adelante, prolifera mayoritariamente (*Figura 5c*).

Aquellos experimentos donde hubo proliferación del control negativo, o en su defecto no tuvieron proliferación en el control positivo, fueron descartados para su análisis posterior por no cumplir los criterios de calidad. Nuestros resultados, muestran a su vez como las 3 poblaciones de CDc del intestino ejercen actividad inmunoestimuladora sobre los linfocitos T naïve, por oposición a los macrófagos (*Figura 3c*).

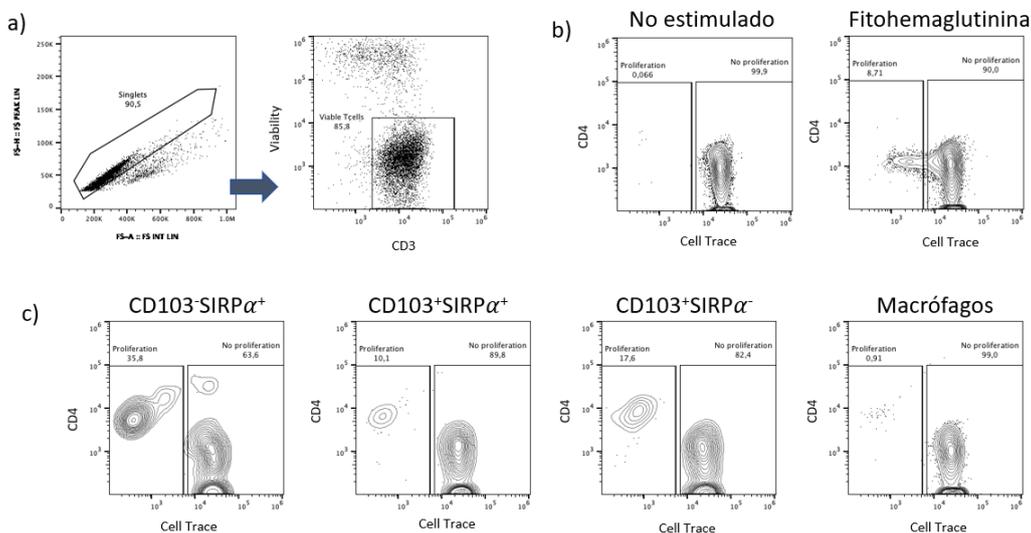


Figura 3. Abordaje de proliferación y controles para las células T estimuladas durante los cocultivos. Las células dendríticas convencionales fueron cultivadas con células T naïve durante 5 días. a) Las células T se identificaron dentro de la fracción singlete como CD3⁺ viables. b) Todos los experimentos incluyeron un control negativo (linfocitos T sin estimular) y un control positivo (linfocitos T estimulados con fitohemaglutina). c) Se muestra un ejemplo representativo de la actividad estimuladora de las 3 sub-poblaciones de CDc y de los macrófagos del intestino.

En el análisis de los resultados que se obtuvieron se puede determinar la expresión de los mediadores celulares, citocinas y factores de transcripción, dentro de la fracción de linfocitos que proliferan con fenotipo T CD4⁺ (*Figura 4*).

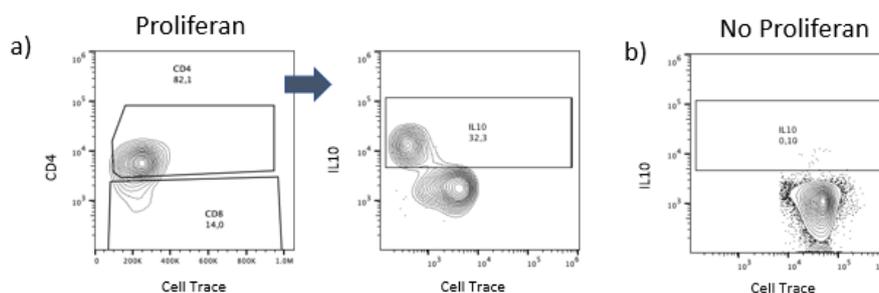


Figura 4. Expresión de citocinas tras el cocultivo. Los linfocitos que han proliferado se identificaron en todos los casos como se detalla en la Figura 3. a) La mayoría de las células que proliferaron fueron linfocitos T CD4⁺, donde se puede determinar la producción de diversas citocinas como IL-10 en este ejemplo. b) Se muestra la producción de IL-10 en los linfocitos T de ese mismo experimento que no habían proliferado, sirviendo de control interno para determinar la producción de IL-10. Se trata de un experimento representativo de varios experimentos independientes, y que es aplicable al resto de mediadores intracelulares que se determinaron en los experimentos.

Para las **muestras de controles** se puede observar una diferencia significativa en la proliferación que son capaces de inducir las subpoblaciones CDc con respecto a los MO, que sirven como control negativo de estimulación. La diferencia se observa tanto para células provenientes de colon como de íleon (Figura 5a).

En cuanto a diferencias dependientes del tejido analizado, tal y como se observa en Figura 5b, las CDc derivadas del íleon son capaces de estimular los linfocitos significativamente más que las derivadas de colon. Debido a la baja proliferación que inducen los macrófagos, se excluye su análisis de aquí en adelante. Además, la mayoría de las células que proliferan se corresponden con fenotipo CD4⁺ irrespectivamente de la sub-población de CDc y del tejido de origen (Figura 5c).

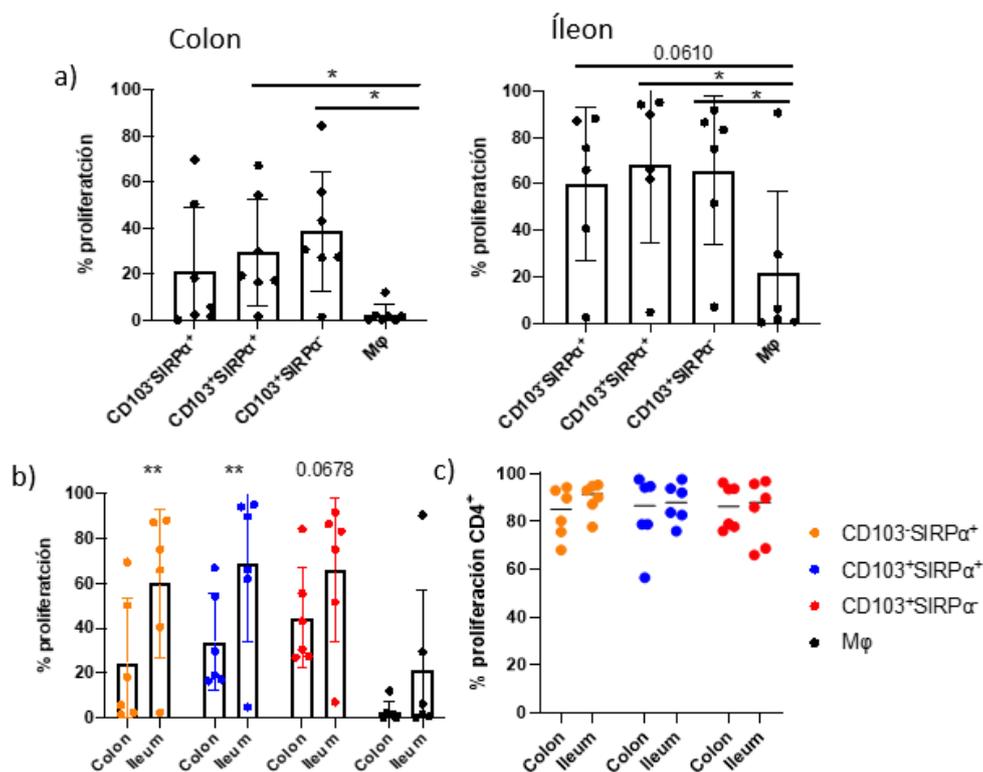


Figura 5. Capacidad estimuladora de las diferentes sub-poblaciones de células dendríticas convencionales (CDc) y de los macrófagos en tejido no afecto de controles sin enfermedad inflamatoria intestinal. a) El porcentaje de proliferación de los linfocitos T naïve se determinó como en la Figura 3 tanto para el colon como para el íleon. b) Esta gráfica muestra la comparación de estimulación entre las diferentes subpoblaciones en función de su localización (muestras pareadas). c) Representa el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ que proliferaron. Se aplicó una prueba ANOVA comparando los porcentajes de estimulación de todas las células entre sí en a). En b) y c) se aplicó un ANOVA de dos vías con muestras pareadas. Se consideró estadísticamente significativo un p-valor < 0,05 (*p<0,05; **p<0,01).

En cuanto a los fenotipos que las CDc han sido capaces de inducir en los linfocitos T estimulados, se puede observar expresión de los tres maestros reguladores estudiados, **FOXP3 (Figura 6a)**, **T-bet (Figura 7a)**, **RORγT (Figura 8a)**. En general los tres factores están menos expresados en aquellos linfocitos que han sido cultivados con CD103⁻SIRPα⁺. Concretamente para FOXP3 se observó que las CDc CD103⁺SIRPα⁻ muestran diferencia significativa en la inducción de la expresión de FoxP3 con respecto a las CDc CD103⁻SIRPα⁺ en el colon, lo cual quiere decir que las últimas no inducen tanto ese fenotipo regulador en los linfocitos T. En el caso del factor T-bet, son las CDc dobles positivas CD103⁺SIRPα⁺ las que muestran diferencia significativa en el colon con respecto CD103⁻SIRPα⁺. Ambos subtipos CD103⁺ inducen expresión de RORγT diferencial significativa con respecto CD103⁻ en el colon.

Sin embargo, dado que los linfocitos T únicamente producen IL-10 (Figura 6c), pero no IFNγ (Figura 7c) ni IL-17a (Figura 8c) parece que las CDc del intestino de los controles sanos inducen un fenotipo regulador en los linfocitos que estimulan. Se observa, a su vez, que son las CDc CD103⁺, tanto las dobles positivas como las CDc1, las que inducen más niveles de expresión de IL-10 en los linfocitos que han estimulado, de acuerdo con lo que se había descrito previamente en la literatura en base a modelos murinos.

No se observan diferencias significativas entre las CDc de ambos tejidos a estudio para la expresión de ninguna de estas moléculas, Figura 6b y d, Figura 7b y d, Figura 8b y d.

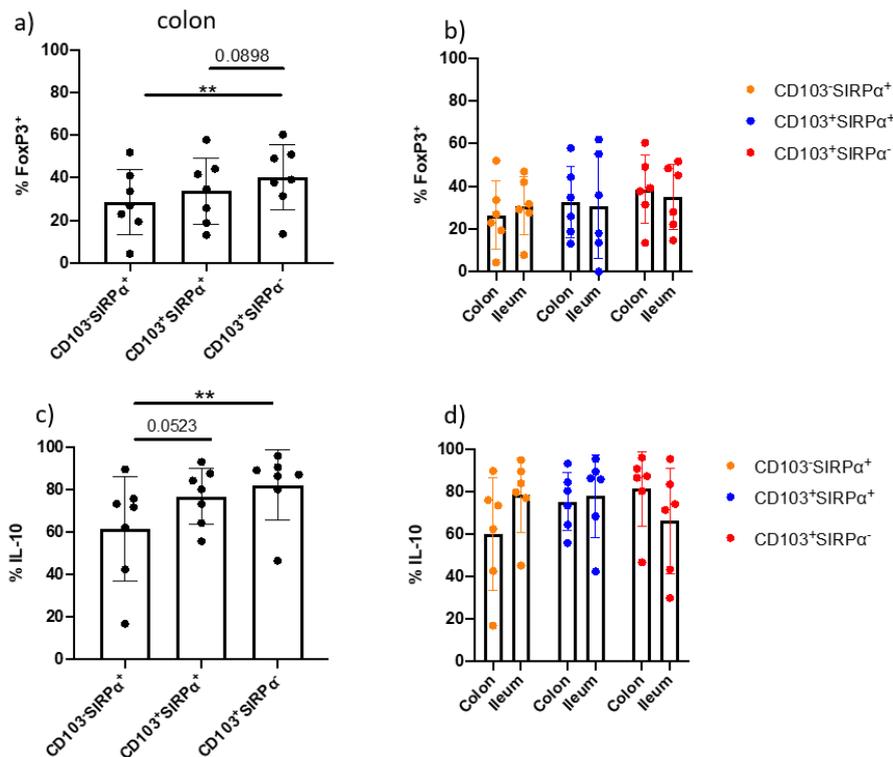


Figura 6. Expresión de fenotipo regulador inducido en las células T estimuladas por células de tejidos de controles. Las células T que proliferaron se identificaron como en la Figura 3, identificando la expresión de la citocina IL-10 y el factor FoxP3 como se detalló en la Figura 4 a) Se representa el porcentaje de linfocitos T que expresan FoxP3 tras haber sido estimulados con las diferentes subpoblaciones de células dendríticas convencionales del colon, así como b) su comparación con el íleon. Los resultados relativos a IL-10 en el colon se muestran en c), siendo d) la comparación entre colon e íleon. Se aplicó test ANOVA comparando los porcentajes de estimulación de todas las células entre sí en a) y en c), y un ANOVA de dos vías con muestras pareadas en b) y d). Se consideró estadísticamente significativo un p-valor < 0,05 (*p<0,05; **p<0,01).

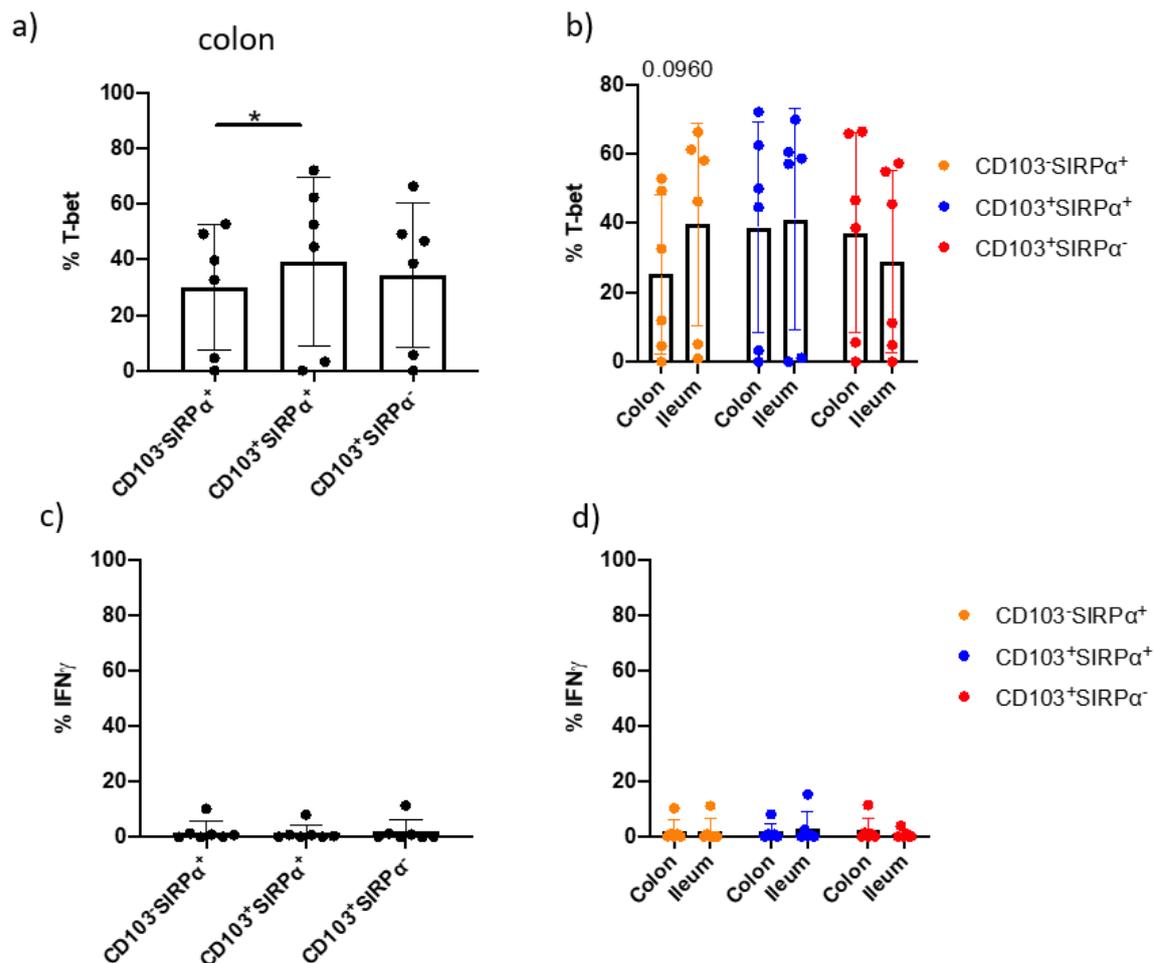


Figura 7. Expresión de fenotipo Th1 inducido en las células T estimuladas por células de tejidos de controles. Las células T que proliferaron se identificaron como en la Figura 3, identificando la expresión de T-bet y la citocina IFN- γ como se detalló en la Figura 4. a) Se representa el porcentaje de linfocitos T que expresan T-bet tras haber sido estimulados con las diferentes sub-poblaciones de células dendríticas convencionales del colon, así como b) su comparación con el íleon. Los resultados relativos a IFN- γ en el colon se muestran en c), siendo d) la comparación entre colon e íleon. Se aplicó una prueba ANOVA comparando los porcentajes de estimulación de todas las células entre sí en a) y en c), y un ANOVA de dos vías con muestras pareadas en b) y d). Se consideró estadísticamente significativo un p-valor < 0,05 (*p<0,05; **p<0,01).

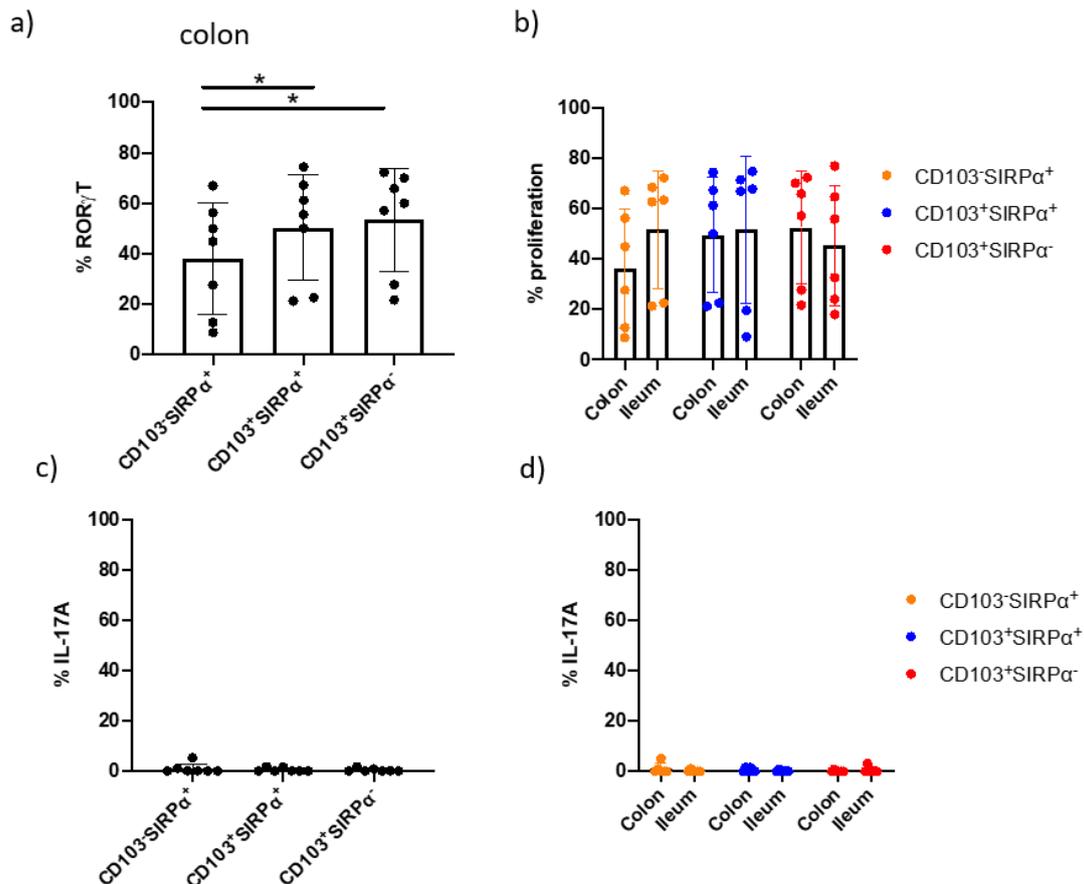


Figura 8. Expresión de fenotipo Th17 inducido en las células T estimuladas por células de tejidos de controles sanos. Las células T que proliferaron se identificaron como en la Figura 3, identificando la expresión de ROR γ T e IL-17A como se detalló en la Figura 4. a) Se representa el porcentaje de linfocitos T que expresan ROR γ T tras haber sido estimulados con las diferentes sub-poblaciones de células dendríticas convencionales del colon, así como b) su comparación con el íleon. Los resultados relativos a IL-17A en el colon se muestran en c), siendo d) la comparación entre colon e íleon. Se aplicó una prueba ANOVA comparando los porcentajes de estimulación de todas las células entre sí en a) y en c), y un ANOVA de dos vías con muestras pareadas en b) y d). Se consideró estadísticamente significativo un p -valor $< 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

En cuanto a los pacientes con EC, se observa que las CDc del colon no afecto de los pacientes con EC inducen (sobre todo las CDc CD103⁺) más proliferación que las CDc de controles sin EC (Figura 9a). Sin embargo, esto no se mantiene al estudiar el íleon no afecto (Figura 9b) o afecto (Figura 9c) con respecto a íleon sano, seguramente por la mayor actividad estimuladora de las CDc de este tejido (Figura 5b). Finalmente, la comparativa entre íleon afecto y no afecto de pacientes con EC (Figura 9d) deja entrever que sí existe una diferencia entre la proliferación bajo estas condiciones, siendo las CDc CD103⁻ derivadas de íleon no afecto más capaces de estimular que las derivadas de íleon EC afecto. En contraposición, las dos subpoblaciones de CDc CD103⁺ derivadas del íleon EC afecto tienen más capacidad estimuladora. Los macrófagos, al igual que se aprecia en los controles, apenas indujeron proliferación.

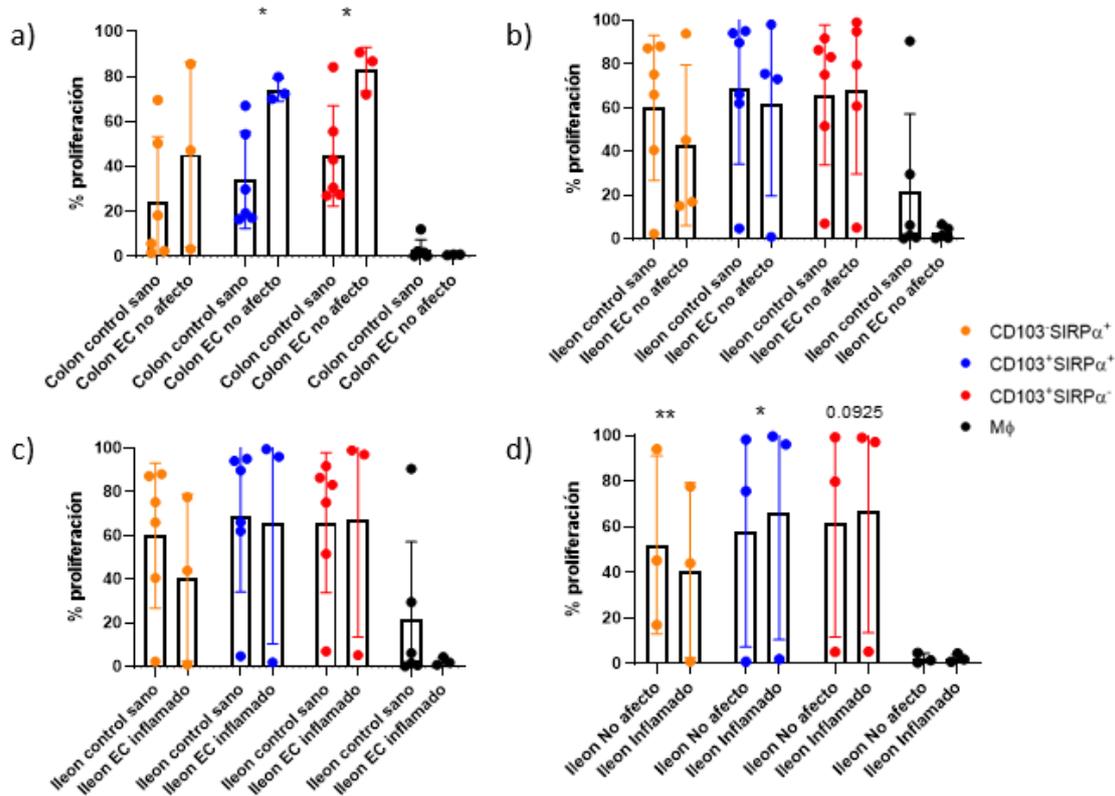


Figura 9. Efecto de la proliferación celular por parte de las sub-poblaciones de células dendríticas en función de su origen tisular. El porcentaje de proliferación de los linfocitos T naïve se determinó como en la Figura 3. a) Se muestra, para cada una de las sub-poblaciones de células dendríticas convencionales y de macrófagos, su actividad estimuladora comparando colon y de pacientes control con el colon no afecto de un paciente con enfermedad de Crohn (EC); b) comparación de un íleon control con el íleon no afecto de un paciente con EC; c) Comparación entre el íleon de un paciente control y el íleon inflamado de paciente con EC; así como d) el íleon afecto y no afecto de un paciente con EC. Se aplicó un ANOVA de dos vías con muestras pareadas en todos los casos. Se consideró estadísticamente significativo un p-valor < 0,05 (*p<0,05; **p<0,01).

Al igual que en los controles la mayoría de las células que proliferan son CD4⁺, (Figura Suplementaria 1) sin diferencias entre las CDc que estimulen ni los tejidos a estudio. En cuanto a la expresión del fenotipo regulador, FOXP3 e IL-10, Figura Suplementaria 2, el maestro regulador se expresa de forma pareja para los tejidos de íleon, tanto control como con EC, para las tres subpoblaciones de dendríticas. Sin embargo, para colon se observa cierta tendencia de las CDc CD103⁻ a inducir más esta expresión en el tejido EC no afecto que en el sano. Esto concuerda con la mayor expresión de IL-10 para las mismas células estimuladoras y el mismo tejido. Además, estas mismas CDc CD103⁻ inducen más expresión de la citada citocina en íleon EC afecto que en íleon EC no afecto. Se observa también para el íleon cierta expresión diferencial de IL-10 en el tejido EC no afecto con respecto al tejido sano y al tejido inflamado para las células CD103⁺SIRP α ⁻.

En cuanto al fenotipo Th1, *Figura Suplementaria 3*, no se observan diferencias significativas para la expresión de Tbet excepto para las CD103⁻ en el colon, expresando este factor de transcripción significativamente más tras la estimulación con las CDc del Colon EC no afecto. Existe diferencia también en la expresión del factor por parte de CD103⁺SIRP α ⁻ en el íleon EC no afecto con respecto a íleon sano. Sin embargo, y al igual que sucedía con la población control, prácticamente no hay expresión de IFN γ .

En el fenotipo Th17, *Figura Suplementaria 4*, sí que se observa sin embargo expresión diferencial de la citocina IL-17A para las células T estimuladas con CDc del íleon EC inflamado con respecto al íleon control y al íleon EC sano. Esto sugiere que las CDc dobles positivas (CDc2 específicas de intestino CD103⁺SIRP α ⁺), de este tejido estarían favoreciendo la diferenciación de linfocitos efectores pro-inflamatorios ya que también expresan ROR γ T. Este factor de transcripción también se induce más por parte de las CDc CD103⁻ en el colon EC no afecto que las mismas células en control sano. Las células CD103⁺SIRP α ⁻ derivadas del íleon EC no afecto parecen estimular más ROR γ T que las correspondientes en íleon sano y de íleon EC inflamado, que ocurre de manera similar para los otros dos factores maestros. Además, podría observarse una ligera diferencia entre íleon EC afecto y no afecto en las poblaciones sencillas, CD103⁻SIRP α ⁺ y CD103⁺SIRP α ⁻.

En resumen, hemos sido capaces con el abordaje propuesto de evaluar la capacidad que tienen las subpoblaciones CDc del intestino humano para estimular a los linfocitos T naïve, determinado diferencias en el fenotipo que inducen las subpoblaciones, tanto para controles sanos como para pacientes con EC.

7. Discusión

A lo largo del trabajo se han visto cumplidos los objetivos inicialmente marcados para el desarrollo del mismo, si bien somos conscientes de que hemos podido disponer de pocos pacientes con EII activa, y por tanto se debe aumentar el número de experimentos cuando sea posible para afianzar los resultados obtenidos. Así mismo se tiene presente que el tejido no afecto de pacientes con tumores intestinales no representa controles sanos de población. Sin embargo, no se somete a un proceso de resección a personas sanas sin afectación intestinal, siendo las resecciones el tipo de muestra necesaria para la extracción de un número suficiente de CDc para realizar ensayos funcionales. Por tanto, en este trabajo el tejido intestinal no afecto de pacientes oncológicos constituye a nuestro juicio el único control adecuado.

En cuanto a la separación de las subpoblaciones de CDc (*Figura 1*) y la purificación de linfocitos T naïve (*Figura 2*), se han observado unos rendimientos adecuados que han permitido llevar a cabo los ensayos de inmunoestimulación, que se han traducido en la proliferación de los linfocitos (*Figura 3*) en los que además se indujeron diversos factores de transcripción y produjeron diversas citocinas. Los controles positivo y negativo de estimulación permiten controlar la estimulación que han sufrido los linfocitos, así como el uso de una estadística pareada a pesar de tratarse de cultivos heterólogos.

Las tres subpoblaciones CDc derivadas de **controles** son capaces de inducir la proliferación, de lo cual no son capaces los macrófagos. Esto es un claro indicador de que en cultivo contamos con linfocitos T naïve y no con otros linfocitos en estadios más maduros, que serían capaces de proliferar incluso en cultivo con los macrófagos.

La proliferación está significativamente aumentada para íleon con respecto al colon, siendo por tanto el íleon el compartimento intestinal que promueve más estimulación sobre linfocitos T (*Figura 5*). La mayor carga bacteriana⁽⁶⁾ que presenta el colon induce un fenotipo más regulador⁽¹³⁾, haciendo que las CDc de este compartimento sean menos estimuladoras como un mecanismo de compensación frente a la alta carga antigénica a la que se encuentran expuestas.

Además, la mayor proporción de linfocitos que proliferan con cualquiera de los tres tipos de CDc, y para ambos tejidos analizados por igual, son de fenotipo CD4⁺, aunque se esperaría que las CDc CD103⁺SIRPα⁻ estimularan hacia CD8⁺ pero que sin embargo no es el caso en nuestras manos⁽⁴²⁾.

En cuanto a los fenotipos que son capaces de inducir las CDc de tejido control, lo que se observa es principalmente una inducción del fenotipo regulador que es además funcional, porque además de expresar el factor FOXP3 expresan la citocina IL-10 (*Figura 6*). Las tres subpoblaciones son capaces de ello, pero significativamente más las CDc CD103⁺. No existe diferencia significativa entre la expresión que inducen las CDc del colon y del íleon, no siendo por tanto el compartimento una variable diferencial en esta cuestión.

Para los fenotipos pro-inflamatorios, Th1 (*Figura 7*) y TH17 (*Figura 8*), sí se observa expresión de los factores maestros correspondientes, Tbet e RORγT. Para Th1 las células CD103⁺SIRPα⁺ en el colon inducen menos expresión que las mismas en el íleon, y menos expresión que el resto de las subpoblaciones de CDc. El factor RORγT, ligado al fenotipo de TH17, está significativamente menos expresado para la subpoblación células CD103⁺SIRPα⁺ que para el resto de CDc en el colon y en comparación con el íleon. Sin embargo, ninguno de los dos fenotipos es funcional puesto que carecen de expresión de su citocina correspondiente. Estos resultados, confirman pues que las subpoblaciones de CDc de la mucosa intestinal no inflamada favorecen la generación de linfocitos T reguladores.

En cuanto al análisis de las CDc del intestino de los pacientes con **Crohn**, se observa que en el colon hay diferencia significativa en la proliferación inducida por las CDc del tejido no afecto con respecto al colon sano, lo cual no existe entre íleon EC e íleon sano (*Figura 9*). Teniendo en cuenta que en los controles se observa una proliferación superior por parte de las dendríticas del íleon, que no mostraban las provenientes de tejido de colon, tiene sentido que no exista diferencia con los tejidos de íleon de pacientes con EC, pero que en el colon EC sí se haga notar esa diferencia por la baja proliferación que muestra el colon sano, lo cual no habríamos observado de no haberse estudiado los distintos compartimentos intestinales.

Sin embargo, cuando se hace la comparativa entre tejido afecto y no afecto de las muestras pareadas de paciente con EC, se observa que las CD103⁻SIRPα⁺ inducen más proliferación en el íleon afecto mientras que las otras dos subpoblaciones, CD103⁺SIRPα⁺ y CD103⁺SIRPα⁻, aparentemente inducen más en el inflamado (*Figura 9d*).

Siendo la proliferación celular mayoritariamente con fenotipo CD4⁺, sin diferencias entre tejido ni CDc como pasaba en los controles, sí se observa sin embargo cierta diferencia en la inducción de fenotipo.

Si bien la expresión de los mediadores relativos al fenotipo regulador se mantiene pareja para el íleon EC con respecto al íleon de los controles (*Figura Suplementaria 2*), se puede observar una diferencia significativa entre el colon EC no afecto y colon sano. Las células CD103⁻SIRPα⁺ estimulan más hacia ese fenotipo regulador, tanto en la expresión de FOXP3 como en IL-10, en pacientes con EC que el mismo subtipo de CDc para el colon sano. Este mismo subtipo celular tiene también expresión diferencial en el colon para la expresión de T-bet, así como para RORγT

Esto quiere decir que en este compartimento intestinal bajo condiciones EC hay más estimulación hacia un fenotipo pro-inflamatorio que en controles, representado por los factores correspondientes aunque no por sus citocinas, por parte del subtipo CD103⁻SIRPα⁺, pero también una diferencia significativa estimulación hacia un fenotipo regulador que podría responder a un intento de inhibición de la respuesta inflamatoria.

Esta misma subpoblación parece también incrementar la expresión de IL-10 en el íleon EC inflamado con respecto al íleon EC no afecto, lo cual no está reflejado por una diferencia significativa en la expresión de FOXP3.

Sin embargo, uno de los principales resultados a destacar es la capacidad que presentan las CDc dobles positivas, CD103⁺SIRPα⁺, en inducir la producción de citocina pro-inflamatoria IL-17a (*Figura Suplementaria 4*) en el íleon inflamado con respecto tanto al íleon control como al íleon EC no afecto. Es decir, el tejido inflamado es el que supone una diferencia a la hora de dirigir el tipo de respuesta de los linfocitos T. Es importante en este punto remarcar que las CDc dobles positivas, si bien están especializadas en generar linfocitos reguladores, en los pacientes con EC parecen favorecer la producción de linfocitos Th17. Esto no es extraño en tanto que ambas vías de diferenciación (Treg y Th17) comparten mecanismos similares de diferenciación, siendo la presencia de IL-6 clave para que además de generar linfocitos reguladores también puedan generar células Th17⁽⁴³⁾.

Aunque el estudio se ha centrado exclusivamente en los pacientes con EC, ya que los enfermos de CU apenas sufren de resecciones intestinales, es de esperar que haya mecanismos subyacentes a ambas patologías relativos al funcionamiento de las CDc que sean similares. Finalmente, pero no por ello menos importante, de cara al futuro sería conveniente ampliar el estudio incluyendo nuevas muestras controles y de pacientes con EC, con el objetivo de estratificar mejor los análisis en función de diversas variables clínicas y demográficas.

8. Conclusiones

- Se ha puesto a punto la técnica de estimulación de linfocitos T heterólogos por parte de diversas subpoblaciones de CDc de la mucosa intestinal humana.
- En los controles, las CDc del íleon tienen más capacidad estimuladora que las provenientes del colon, aunque el fenotipo no difiera.
- Las tres subpoblaciones de CDc estimulan más a los linfocitos T CD4⁺, irrespectivamente del origen.
- Las DCs del intestino de controles, independientemente del compartimento del que procedan, inducen un perfil tolerogénico funcional en los linfocitos que estimulan ya que además de expresar FOXP3 expresan IL-10, pero no las citocinas pro-inflamatorias IL-17a ni IFN γ .
- Tal y como recoge la bibliografía, las CDc CD103⁺ son las que generan más linfocitos reguladores.
- Las CDc del colon de los pacientes EC induce la proliferación significativamente más que en el colon sano, lo cual no se observa para el íleon. Sin embargo, el íleon afecto sí es capaz de estimular más que el no afecto para las subpoblaciones de CDc CD103⁺.
- La subpoblación de CDc CD103⁻SIRP α ⁺ es aquella que muestra en colon no afecto de pacientes con EC, la mayor diferencia en la expresión de los 3 factores de transcripción, así como una diferencia significativa en la expresión de la citocina reguladora IL-10. Está por tanto esta subpoblación, en este tejido, íntimamente ligada a la diferencia en estimulación que se produce hacia fenotipos pro-inflamatorios no funcionales, pero también a la compensación de los mismos estimulando un fenotipo regulador.
- La subpoblación que parece promover la citocina pro-inflamatoria IL-17a es la CD103⁺SIRP α ⁺ en íleon EC inflamado con respecto a EC no afecto y a íleon sano, estando por tanto condicionado por la condición inflamatoria y no por padecer o no EC.

9. Bibliografía

1. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* [Internet]. 2012 Jan;142(1):46-54.e42; quiz e30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2011.10.001>
2. Bernardo D, Chaparro M, Gisbert JP. Human Intestinal Dendritic Cells in Inflammatory Bowel Diseases. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2018 Apr;62(7):e1700931. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/mnfr.201700931>
3. Fernández-Tomé S, Marin AC, Ortega Moreno L, Baldan-Martin M, Mora-Gutiérrez I, Lanas-Gimeno A, et al. Immunomodulatory Effect of Gut Microbiota-Derived Bioactive Peptides on Human Immune System from Healthy Controls and Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Nutrients* [Internet]. 2019 Oct 31;11(11):2605. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/11/2605>
4. Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2014 Oct 19;14(10):667–85. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri3738>
5. Pabst O, Mowat AM. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2012 May 8;5(3):232–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2012.4>
6. Mann ER, Bernardo D, English NR, Landy J, Al-Hassi HO, Peake STC, et al. Compartment-specific immunity in the human gut: properties and functions of dendritic cells in the colon versus the ileum. *Gut* [Internet]. 2016 Feb;65(2):256–70. Available from: <https://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2014-307916>
7. MacDonald TT, Monteleone I, Fantini MC, Monteleone G. Regulation of Homeostasis and Inflammation in the Intestine. *Gastroenterology* [Internet]. 2011 May;140(6):1768–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2011.02.047>
8. Mowat AM. To respond or not to respond - a personal perspective of intestinal tolerance. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2018 Jun 28;18(6):405–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-018-0002-x>
9. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2003 Apr;3(4):331–41. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri1057>
10. König J, Wells J, Cani PD, García-Ródenas CL, MacDonald T, Mercenier A, et al. Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease. *Clin Transl Gastroenterol* [Internet]. 2016 Oct;7(10):e196. Available from: <https://journals.lww.com/01720094-201610000-00003>
11. Vich Vila A, Imhann F, Collij V, Jankipersadsing SA, Gurry T, Mujagic Z, et al. Gut microbiota composition and functional changes in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Sci Transl Med* [Internet]. 2018 Dec 19;10(472):eaap8914. Available from: <https://stm.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/scitranslmed.aap8914>
12. Baumgart DC. Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells. *Gut* [Internet]. 2005 Feb 1;54(2):228–36. Available from: <https://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gut.2004.040360>
13. Bernardo D, Durant L, Mann ER, Bassity E, Montalvillo E, Man R, et al. Chemokine (C-C Motif) Receptor 2 Mediates Dendritic Cell Recruitment to the Human Colon but Is Not Responsible for Differences Observed in Dendritic Cell Subsets, Phenotype, and Function Between the Proximal and Distal Colon. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2016 Jan;2(1):22-39.e5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352345X15001514>
14. Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S. Smoking and Inflammatory Bowel Disease: A Meta-analysis. *Mayo Clin Proc* [Internet]. 2006 Nov;81(11):1462–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17120402>
15. Mahid SS, Minor KS, Stevens PL, Galandiuk S. The Role of Smoking in Crohn's Disease as Defined by Clinical Variables. *Dig Dis Sci* [Internet]. 2007 Sep 28;52(11):2897–903. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10620-006-9624-0>
16. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid

- organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* [Internet]. 1973 May 1;137(5):1142–62. Available from: <https://rupress.org/jem/article/137/5/1142/6389/IDENTIFICATION-OF-A-NOVEL-CELL-TYPE-IN-PERIPHERAL>
17. Merad M, Manz MG. Dendritic cell homeostasis. *Blood* [Internet]. 2009 Apr 9;113(15):3418–27. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/113/15/3418/24971/Dendritic-cell-homeostasis>
 18. Granucci F, Zanoni I, Ricciardi-Castagnoli P. Central role of dendritic cells in the regulation and deregulation of immune responses. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2008 Jun 10;65(11):1683–97. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-008-8009-2>
 19. Scott CL, Aumeunier AM, Mowat AM. Intestinal CD103+ dendritic cells: master regulators of tolerance? *Trends Immunol* [Internet]. 2011 Sep;32(9):412–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490611001001>
 20. Bernardo D. Human intestinal dendritic cells as controllers of mucosal immunity. *Rev Española Enfermedades Dig* [Internet]. 2013 Jun;105(5):279–90. Available from: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-01082013000500006&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 21. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* [Internet]. 1998 Mar;392(6673):245–52. Available from: <http://www.nature.com/articles/32588>
 22. Chirido FG, Millington OR, Beacock-Sharp H, Mowat AM. Immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria. *Eur J Immunol* [Internet]. 2005 Jun;35(6):1831–40. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.200425882>
 23. Stagg AJ, Hart AL, Knight SC, Kamm MA. The dendritic cell: its role in intestinal inflammation and relationship with gut bacteria. *Gut* [Internet]. 2003 Oct 1;52(10):1522–9. Available from: <https://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gut.52.10.1522>
 24. Guilliams M, van de Laar L. A hitchhiker's guide to myeloid cell subsets: Practical implementation of a novel mononuclear phagocyte classification system. Vol. 6, *Frontiers in Immunology*. 2015.
 25. Sichien D, Lambrecht BN, Guilliams M, Scott CL. Development of conventional dendritic cells: From common bone marrow progenitors to multiple subsets in peripheral tissues. Vol. 10, *Mucosal Immunology*. 2017. p. 831–44.
 26. Watchmaker PB, Lahl K, Lee M, Baumjohann D, Morton J, Kim SJ, et al. Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice. *Nat Immunol* [Internet]. 2014 Jan 1;15(1):98–108. Available from: <http://www.nature.com/articles/ni.2768>
 27. Jaensson E, Uronen-Hansson H, Pabst O, Eksteen B, Tian J, Coombes JL, et al. Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *J Exp Med* [Internet]. 2008 Sep 1;205(9):2139–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18710932>
 28. Mann ER, Bernardo D, Al-Hassi HO, English NR, Clark SK, McCarthy NE, et al. Human gut-specific homeostatic dendritic cells are generated from blood precursors by the gut microenvironment. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2012 Jul;18(7):1275–86. Available from: <https://academic.oup.com/ibdjournal/article/18/7/1275-1286/4607713>
 29. Magnusson MK, Brynjólfsson SF, Dige A, Uronen-Hansson H, Börjesson LG, Bengtsson JL, et al. Macrophage and dendritic cell subsets in IBD: ALDH+ cells are reduced in colon tissue of patients with ulcerative colitis regardless of inflammation. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2016 Jan 17;9(1):171–82. Available from: <http://www.nature.com/articles/mi201548>
 30. Sun C-M, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, et al. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* [Internet]. 2007 Aug 6;204(8):1775–85. Available from: <https://rupress.org/jem/article/204/8/1775/46985/Small-intestine-lamina-propria-dendritic-cells>
 31. Kinnebrew MA, Buffie CG, Diehl GE, Zenewicz LA, Leiner I, Hohl TM, et al. Interleukin 23 Production by Intestinal CD103+CD11b+ Dendritic Cells in Response to Bacterial

- Flagellin Enhances Mucosal Innate Immune Defense. *Immunity* [Internet]. 2012 Feb 24;36(2):276–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2011.12.011>
32. Agace WW, McCoy KD. Regionalized Development and Maintenance of the Intestinal Adaptive Immune Landscape. *Immunity* [Internet]. 2017 Apr 18;46(4):532–48. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761317301371>
 33. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* [Internet]. 2009 May;30(5):626–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2009.05.002>
 34. Mann ER, Landy JD, Bernardo D, Peake STC, Hart AL, Al-Hassi HO, et al. Intestinal dendritic cells: Their role in intestinal inflammation, manipulation by the gut microbiota and differences between mice and men. *Immunol Lett* [Internet]. 2013 Feb;150(1–2):30–40. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165247813000096>
 35. Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel A V., Knight SC, et al. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* [Internet]. 2005 Jul;129(1):50–65. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508505008838>
 36. Mann ER, Bernardo D, Ng SC, Rigby RJ, Al-Hassi HO, Landy J, et al. Human Gut Dendritic Cells Drive Aberrant Gut-specific T-cell Responses in Ulcerative Colitis, Characterized by Increased IL-4 Production and Loss of IL-22 and IFN γ . *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2014 Dec;20(12):2299–307. Available from: <https://academic.oup.com/ibdjournal/article/20/12/2299-2307/4578976>
 37. Matsuno H, Kayama H, Nishimura J, Sekido Y, Osawa H, Barman S, et al. CD103+ Dendritic Cell Function Is Altered in the Colons of Patients with Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2017 Sep;23(9):1524–34. Available from: <https://academic.oup.com/ibdjournal/article/23/9/1524-1534/4560718>
 38. Al-Hassi HO, Mann ER, Sanchez B, English NR, Peake STC, Landy J, et al. Altered human gut dendritic cell properties in ulcerative colitis are reversed by *Lactobacillus plantarum* extracellular encrypted peptide STp. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2014 May 18;58(5):1132–43. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.201300596>
 39. Ng SC, Benjamin JL, McCarthy NE, Hedin CRH, Koutsoumpas A, Plamondon S, et al. Relationship between human intestinal dendritic cells, gut microbiota, and disease activity in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2011 Oct;17(10):2027–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21910165>
 40. Bernardo D, Marin AC, Fernández-Tomé S, Montalban-Arques A, Carrasco A, Tristán E, et al. Human intestinal pro-inflammatory CD11c^{high}CCR2⁺CX3CR1⁺ macrophages, but not their tolerogenic CD11c⁺CCR2⁺CX3CR1⁺ counterparts, are expanded in inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2018 Jul 9;11(4):1114–26. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41385-018-0030-7>
 41. Hafsı N, Voland P, Schwendy S, Rad R, Reindl W, Gerhard M, et al. Human Dendritic Cells Respond to *Helicobacter pylori*, Promoting NK Cell and Th1-Effector Responses In Vitro. *J Immunol* [Internet]. 2004 Jul 15;173(2):1249–57. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.173.2.1249>
 42. Cerovic V, Houston SA, Westlund J, Utriainen L, Davison ES, Scott CL, et al. Lymph-borne CD8 α ⁺ dendritic cells are uniquely able to cross-prime CD8⁺ T cells with antigen acquired from intestinal epithelial cells. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2015 Jan 11 [cited 2021 Jul 1];8(1):38–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24850430/>
 43. Bernardo D, Vallejo-Díez S, Mann ER, Al-Hassi HO, Martínez-Abad B, Montalvillo E, et al. IL-6 promotes immune responses in human ulcerative colitis and induces a skin-homing phenotype in the dendritic cells and T cells they stimulate. *Eur J Immunol* [Internet]. 2012 May;42(5):1337–53. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.201142327>

10. Anexos

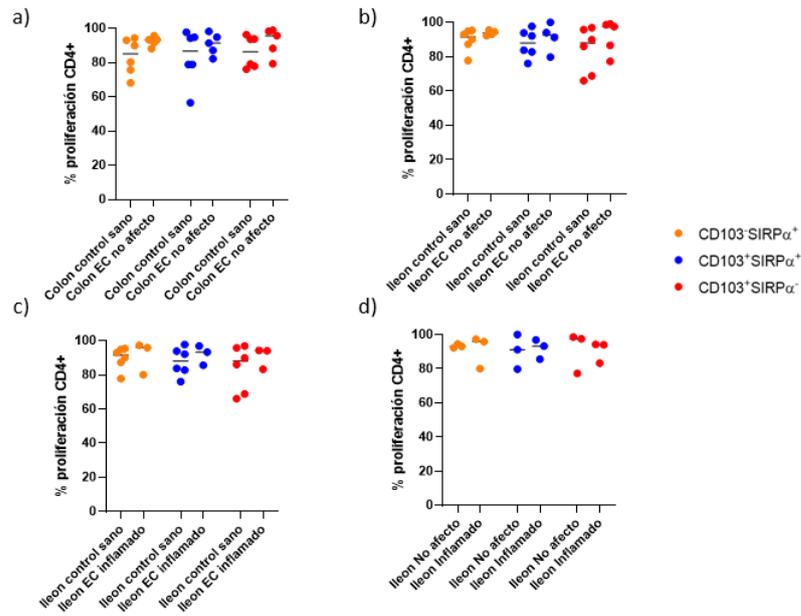


Figura Suplementaria 1. Diferencia en la proliferación CD4⁺ en tejido sano, EC no afecto y EC afecto atendiendo a la subpoblación intestinal. Se estudió el porcentaje de células que proliferaban que eran CD4⁺ como se detalló en la Figura 5c entre diferentes tejidos como se describió en la Figura 9. Se aplicó un ANOVA de dos vías con muestras pareadas en todos los casos. Se consideró estadísticamente significativo un p-valor < 0,05 (*p<0,05; **p<0,01).

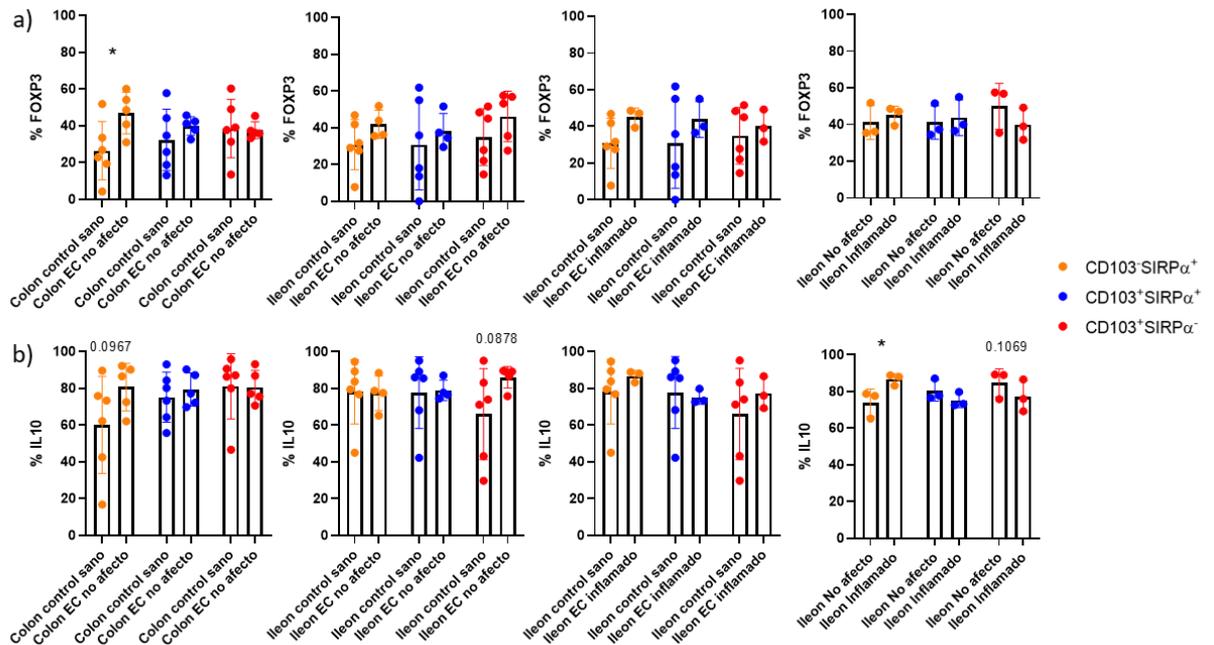


Figura Suplementaria 2. Expresión de fenotipo regulador inducido en las células T estimuladas por células de tejidos sano, EC no afecto y EC afecto. Las células que proliferaban y expresaban FOXP3 o IL-10 se identificaron como se detalla en la Figura 6, realizando la comparativa entre células de diferentes tejidos como se describió en la Figura 9. Se aplicó un ANOVA de dos vías con muestras pareadas en todos los casos. Se consideró estadísticamente significativo un p-valor < 0,05 (*p<0,05; **p<0,01).

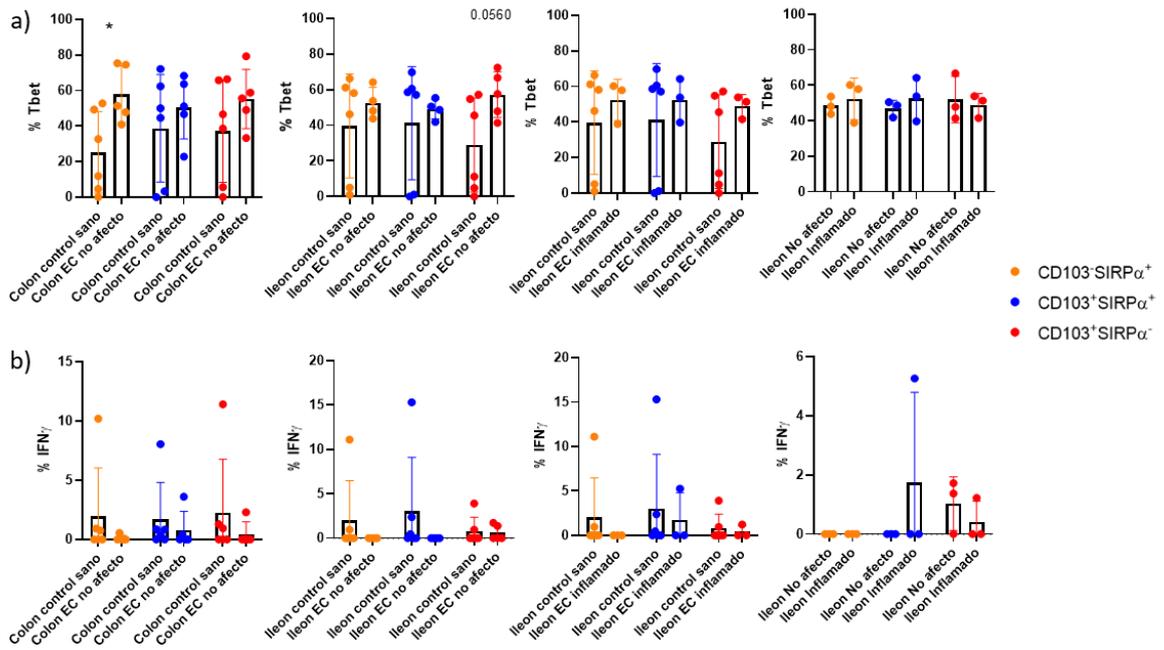


Figura Suplementaria 3. Expresión de fenotipo Th1 inducido en las células T estimuladas por células de tejidos sano, EC no afecto y EC afecto. Las células que proliferaban y expresaban T-bet e IFN- γ se identificaron como se detalla en la Figura 7, realizando la comparativa entre células de diferentes tejidos como se describió en la Figura 9. Se aplicó un ANOVA de dos vías con muestras pareadas en todos los casos. Se consideró estadísticamente significativo un p-valor < 0,05 (*p<0,05; **p<0,01).

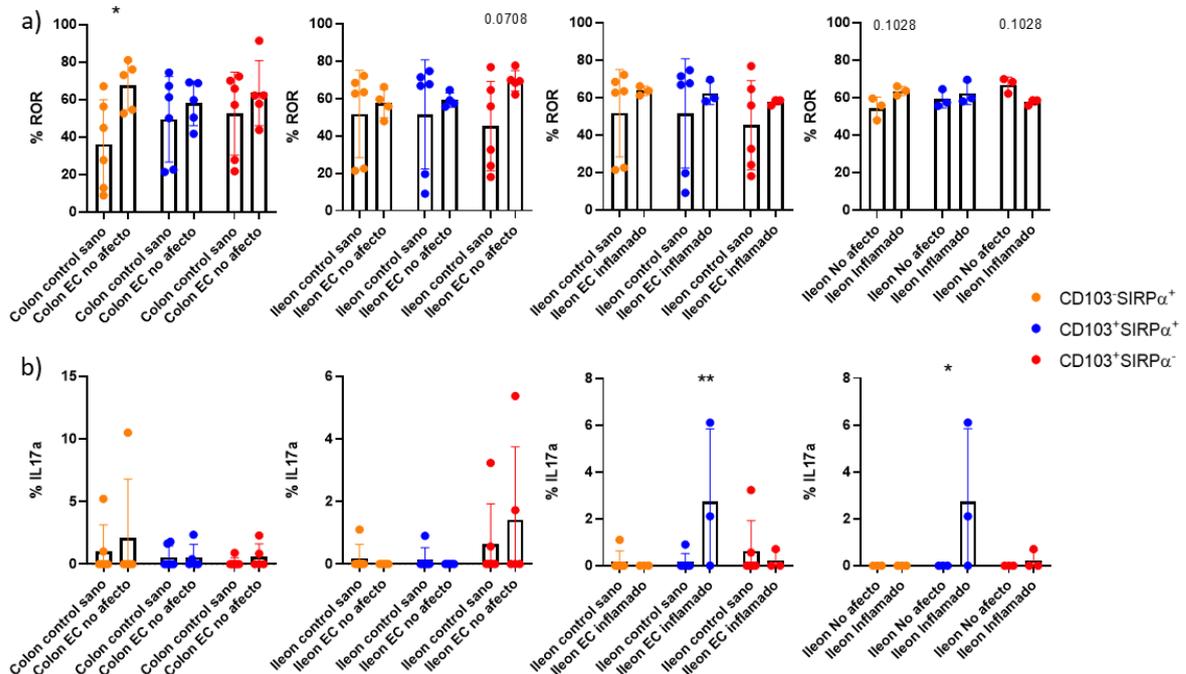


Figura Suplementaria 4. Expresión de fenotipo Th17 inducido en las células T estimuladas por células de tejidos sano, EC no afecto y EC afecto. Las células que proliferaban y expresaban ROR γ T e IL-17A se identificaron como se detalla en la Figura 8, realizando la comparativa entre células de diferentes tejidos como se describió en la Figura 9. Se aplicó un ANOVA de dos vías con muestras pareadas en todos los casos. Se consideró estadísticamente significativo un p-valor < 0,05 (*p<0,05; **p<0,01).