

# FENOTIPO DE LOS LINFOCITOS INTRAEPITELIALES EN EL DUODENO HUMANO

**Trabajo Fin de Máster**  
Curso 2020/2021

***Autor: Virginia Blanco Jimeno***

***Tutores: David Bernardo Ordiz, Eduardo Arranz Sanz***

Firmado por BERNARDO ORDIZ,  
DAVID (FIRMA) el día 01/07/2021  
con un certificado emitido por



Universidad de Valladolid



AC DNIE 005

## INDICE

<b>1. INTRODUCCION.....</b>	<b>4</b>
1.1 Definición y prevalencia.....	4
1.2 Tratamiento.....	4
1.3 Factores desencadenantes de la EC.....	4
➤ Factores genéticos.....	4
➤ Factores ambientales.....	5
➤ Factores inmunológicos.....	5
1.4 Signos clínicos.....	7
1.5 Linfocitos intraepiteliales intestinales.....	7
1.6 Diagnóstico.....	7
1.7 Linfograma.....	8
1.8 Hipótesis.....	9
1.9 Objetivos.....	9
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>10</b>
2.1 Obtención de muestras común.....	10
2.2 Demografía y pacientes a estudio.....	10
➤ Linfograma.....	10
➤ Cultivos.....	10
2.3 Reactivos.....	10
2.4 Soluciones preparadas a partir reactivos.....	11
2.5 Material.....	12
2.6 Equipamiento.....	12
2.7 Procesamiento de las muestras biológicas.....	13
➤ Obtención de LIE.....	13
➤ Tinción extracelular.....	13
➤ Aislamiento LIE.....	14
➤ Cultivo IEL.....	14
2.8 Citometría de flujo.....	15
2.9 Tratamiento estadístico.....	15
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>16</b>
3.1 Identificación de LIE, T $\gamma\delta^+$ , T clásicos y NK-like.....	16
3.2 Ejemplos estrategia de identificación de NKG2D, IL-15R $\alpha$ e IL-2R $\beta$ .....	16
➤ Expresión NKG2D en las subpoblaciones de LIES.....	19
➤ Expresión de IL-15 R $\alpha$ en las subpoblaciones de LIE.....	21
➤ Expresión de IL-15 R $\alpha$ /IL-2 R $\beta$ en las subpoblaciones de LIE.....	21

➤ Estimulación de los LIE para realizar ensayos funcionales .....	24
<b>4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>25</b>
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>26</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>27</b>

## **RESUMEN**

La enfermedad celíaca (EC) es una patología autoinmune que se produce por la intolerancia permanente a las proteínas del gluten de la dieta. Cursa con una atrofia de la mucosa del intestino delgado y como consecuencia con una malabsorción de nutrientes. El diagnóstico es complejo debido a las diferentes presentaciones de la EC. El linfograma epitelial se utiliza para el diagnóstico, ya que ayuda a la evaluación del porcentaje de linfocitos intraepiteliales (LIE) en concreto de la ratio de la subpoblación  $T\gamma\delta^+$  y NK-like, a través de citometría de flujo. En nuestro trabajo, hemos hecho una comparativa entre distintos grupos de estudio, determinando distintas subpoblaciones de LIE, potencialmente responsables de este trastorno, así como la expresión de algunos receptores especialmente en los grupos de estudio de EC activa y EC en tratamiento.

Palabras clave: enfermedad celíaca, linfocitos intraepiteliales, linfograma, mucosa intestinal, IL-15, NKG2D.

## 1. INTRODUCCION

### 1.1 Definición y prevalencia

La enfermedad celiaca (EC), es un desorden inflamatorio del intestino delgado desencadenado por la ingestión de gluten de trigo y otras prolaminas en individuos genéticamente susceptibles (1). La prevalencia estimada es del 1% y afecta más en mujeres (2).

El gluten está constituido por muchos péptidos inmunogénicos no digeribles, como la 33-mer de la  $\alpha$ -gliadina. Estos péptidos son ricos en prolina y en glutaminas. Varios estudios han demostrado que la gliadina incrementa la permeabilidad entre de las células intestinales epiteliales, ya que produce liberación de zonulina y por lo tanto un aumento de permeabilidad en el epitelio intestinal (2).

Tras la Segunda Guerra Mundial, el pediatra Neerlandés Dr. W.K. Dicke, comprobó que los niños con diarrea crónica y desnutrición que estaban hospitalizados mejoraban al retirarles el gluten de la dieta siendo por tanto la dieta sin gluten el único tratamiento eficaz para la EC(3) .

En 1957 John Paulley en el Reino Unido, describió por primera vez daño el yeyunal típico asociado con celíacos activos (4). Desde entonces, el análisis histológico de muestras de biopsia del intestino delgado se ha convertido en el estándar de oro para el diagnóstico de la enfermedad celíaca(4).

### 1.2 Tratamiento

El tratamiento más seguro y eficaz para los pacientes con EC es una dieta sin gluten (DSG) estricta y de por vida, gracias a lo que los pacientes mejoran su calidad de vida, los síntomas, previene la recurrencia enfermedad celiaca refractaria, yeyunoileitis ulcerosa, así como previenen adenocarcinoma y linfoma del intestino delgado (2).

Otras alternativas están basadas en la modificación de gluten: Cepas de trigo modificadas genéticamente como son el Psyllium o harinas pretratadas, las terapias intraluminales: detoxificación de gluten usando proteasas digestivas, polímeros secuestrante de gluten y anticuerpos neutralizantes de gluten, inmunomodulación y tolerancia al gluten: terapia de Helmintos, inducción de la tolerancia de la mucosa y vacuna modulación de la permeabilidad intestinal, los receptores antagonistas de la zonulina y modulación de la respuesta inmune adaptativa: como son los Inhibidores de la transglutaminasa o bloqueantes de HLA- DQ2 (5).

Estas terapias son menos rentables que el cumplimiento estricto de la DSG, pero puede ser útil cuando se usan durante un periodo corto de tiempo(5).

### 1.3 Factores desencadenantes de la EC

La EC se origina como consecuencia de la interacción de varios factores, incluyendo factores genéticos, ambientales e inmunológicos.

#### ➤ Factores genéticos

Tiene especial relevancia los heterodímeros del complejo mayor de histocompatibilidad, en concreto el "*human lymphocyte antigen*" (HLA) y, específicamente, el DQ2 y DQ8 en la herencia de EC. La homocigosis de HLA-DQ2, confiere más riesgo de desarrollar un temprano comienzo de EC en niños que tenga un familiar de primer grado afectado por la enfermedad(2). Los heterodímeros HLA-DQ2 y DQ8 tienen un papel en la presentación de gluten a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y de la acción de ciertos fragmentos de las gliadinas sobre el epitelio (1).

La principal laguna en el conocimiento de la patogenia de la EC es explicar porque solo unos pocos individuos portadores del HLA de riesgo desarrollan la enfermedad (1). El HLA-DQ2 está presente en un 90% de los pacientes con EC y el DQ8 en el 5-10% restante. Debido a que la presencia de estos marcadores de susceptibilidad es elevada en la población general (en torno al 30%), la ausencia de estos alelos es importante por su elevado valor predictivo negativo. Su presencia, por tanto, es una condición necesaria pero no suficiente para desarrollar la enfermedad, y es importante a la hora de realizar estudios familiares y de instaurar una DSG en pacientes cuyas pruebas diagnósticas no sean concluyentes (3).

Otros genes del sistema HLA-I, como el MICA y el MICB, se han encontrado asociados a diversas enfermedades autoinmunitarias, entre ellas, la EC(3).

#### ➤ Factores ambientales

La mejora de la higiene y la falta de exposición a diferentes microorganismos está relacionada con un incremento de los desórdenes autoinmunes(2) . Sin embargo, existen otros factores como son por ejemplo el aumento de la alimentación procesada, que podrían aumentar la incidencia de EC, ya sea de forma directa o indirecta al modificar la microbiota (6).

El papel de la microbiota intestinal en la EC parece cada vez más claro. Lactantes con HLA-DQ2 y HLA-DQ8, así como parientes de primer grado con EC muestran niveles aumentado *Firmicutes* y *Proteobacteria* y menos *Actinobacteria* y *Bifidobacterium*, lo que sugiere que el genotipo HLA está asociado con la colonización intestinal por bacterias específicas (2)(6)(7). Por otro lado, la lactancia materna tiene un efecto protector en el desarrollo de la EC (6). Se ha estudiado que los bebés nacidos por cesárea tienen más prevalencia a desarrollar EC que los nacidos por parto natural, ya que adquieren bacterias maternas de la vagina y de la flora perianal (6) .La colonización del recién nacido se atribuye al desarrollo del sistema inmune y determina la susceptibilidad a desórdenes del sistema inmune (6).

Por otro lado, tanto en las muestras de heces como en las biopsias duodenales se han encontrado un aumento de los organismos Gram<sup>-</sup> : *Bacteroides*, *Clostridium* y *E. Coli* en adultos con EC, en comparación con adultos sanos (8). Se produce por tanto una disbiosis intestinal en pacientes con EC, tratados o sin tratar con la dieta sin gluten (DSG), único tratamiento actual para la EC (7)(8). Además, los cambios en la microbiota pueden contribuir a la enfermedad incrementando la permeabilidad intestinal (7). Todos estos factores hacen que los probióticos están considerados como una estrategia para modular el microbioma intestinal, hacia un estado antiinflamatorio (7)(8).

#### ➤ Factores inmunológicos

Los péptidos de gliadina desencadenan una respuesta inmune innata en la mucosa de los pacientes con EC (9). Se produce Interleucina Interleucina-15 (IL-15) por parte de los enterocitos, lo que origina la estimulación de los linfocitos intraepiteliales (LIE) que expresan el receptor NKG2D, un marcador natural de las células citolíticas NK-like. Estas células activadas son citotóxicas y destruyen las células del epitelio intestinal (3).

Por otro lado, estos péptidos de gluten son desamidados por la transglutaminasa en la mucosa intestinal, haciéndoles apropiados para unirse a la HLA clase II DQ2 o DQ8 que son los que tienen predisposición genética a la enfermedad celiaca (10). En consecuencia, los linfocitos CD4<sup>+</sup> reconocen a los péptidos de la gliadina presentados por las moléculas HLA de clase DQ2 y DQ8 en la lámina propia. Esto se traduce en que los linfocitos CD4<sup>+</sup> se activan y producen IFN $\gamma$ , acompañado de una infiltración intestinal de linfocitos T CD8<sup>+</sup> que representa uno de los sellos distintivos de la enfermedad (10).

Dentro de los factores inmunológicos que median el daño tisular en la EC, en este trabajo nos centraremos en dos en concreto, como son el receptor de la IL-15 y el receptor NKG2D.

#### ▪ Interleucina 15

La IL-15 es una citocina del grupo de las citocinas tipo 1, que se encarga de regular la homeostasis inmune. Existen estudios que demuestran que la sobreexpresión de IL-15 puede estar implicada en el desarrollo de desórdenes autoinmunes (11).

Su receptor comparte la cadena  $\beta$  con la del receptor de la Interleucina-2 (IL-2) (11). Para que el receptor sea funcional, se requiere de asociación de las dos cadenas, constituido por tanto por el heterodímero IL-15R $\alpha$ /IL-2R $\beta$  (11)(12). Esto conlleva a la activación de STAT5 y a la consecuente proliferación de linfocitos T (11). La IL-15 se produce por variedad tanto de células inmunes, como no inmunes esenciales para la homeostasis de CD8<sup>+</sup>, NK, NKT y linfocitos  $\gamma\delta^+$  (12).

La gliadina da lugar a una respuesta innata de IL-15 a todos los individuos. En pacientes con EC, o en los pacientes genéticamente predispuestos (HLA-DQ2/DQ8), se propone la existencia de un umbral de la IL-15 más bajo, debido a la mayor expresión de IL-15R $\alpha$ , así como una mayor expresión de otros mediadores inmunes (9). Además, IL-15R $\alpha$  está sobreexpresada en el intestino de los pacientes con EC, donde no sólo media el daño epitelial, sino que también mantiene una persistente activación del sistema inmune adaptativo(13).

#### ▪ Receptor NKG2D

Las NK y Linfocitos T, mantienen una vigilancia hacia células infectadas, transformadas y/o estresadas sin provocar reacciones inmunes (10).

Los linfocitos NK son reguladas por un gran número de receptores inhibidores que reconocen las células normales. Las células transformadas o infectadas pueden disminuir los ligandos de los receptores inhibitorios o incrementar la expresión de los ligandos para los receptores que activan. El balance en la expresión de activación o inhibición determinará si una célula comienza a ser objetivo para ser eliminadas para las NK-like(10).

MICA/ B son moléculas que se inducen por estrés, que actúan como señales del peligro para alertar tanto a las células NK-like como a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> a través de la unión con el receptor NKG2D. Los MIC están especializados para reportar estrés sin el requisito de la unión al péptido (u otro ligando) y pueden dirigir las células NK y T hacia la eliminación de células transformadas o infectadas. Dado que NKG2D se expresa en las NK humanos, así como en los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, la adquisición de su ligando en la superficie de las células diana puede dar lugar a que se rompa la tolerancia e inducir a la destrucción de células epiteliales(10)(13).

Las moléculas MIC, si son inducidas inespecíficamente por un proceso inflamatorio o expresando inapropiadamente en individuos predispuestos, pueden desencadenar o exacerbar una respuesta autoinmune (10). En conjunto, estos datos señalan el papel crucial de la respuesta inmune innata en el daño de la mucosa intestinal, que se debe principalmente a la citólisis de la capa epitelial mediada por IEL activado a través de NKG2D, relacionando la temprana activación de la inmunidad innata con la respuesta inmune adaptativa de CD4<sup>+</sup> (10)(13).

#### **1.4 Signos clínicos**

La clínica puede presentar diferentes fenotipos como son: gastrointestinal, extraintestinal, subclínica, potencial seronegativo, que no responde al tratamiento y refractaria.(2)

En cualquier caso, la EC está caracterizada por atrofia de las vellosidades, hiperplasia de las criptas y un aumento de la infiltración de los LIE (9). La inflamación de la mucosa y el desarrollo de la lesión intestinal, son secundarios a la superposición de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa, que conducen la producción local de citocinas por los linfocitos T locales (1).

La enfermedad puede ocurrir en cualquier edad, desde la infancia hasta la vejez, siendo el diagnóstico en adultos más difícil porque se trata de casos con menor afectación digestiva (2)(3). En los niños, la EC generalmente se pone de manifiesto con las papillas en la alimentación, entre los 6 meses y los 2 años. En general se manifiesta en forma de clínica intestinal o forma clásica: diarrea crónica, distensión abdominal, pérdida de peso y retraso de crecimiento (3).

En el adulto, la presentación puede muy variada y no tan característica, lo que se denominan formas atípicas (3). Son frecuentes manifestaciones de la enfermedad como son: anemia crónica, osteoporosis, estreñimiento, síntomas neurológicos, lesiones cutáneas del tipo dermatitis herpetiforme, hipoproteinemia, hipocalcemia y/o pruebas de función hepática alteradas (2)(3). Estas manifestaciones se pueden revertir con la DSG (2).

Las lesiones cutáneas del tipo dermatitis herpetiforme, caracterizadas por vesículas, costras y fisuras localizadas en las extremidades, en la palma de las manos, planta de los pies, cuero cabelludo, y acompañadas de intenso prurito, son muy características (3).

#### **1.5 Linfocitos intraepiteliales intestinales**

Los LIE constituyen una población heterogénea (14). Están dispersos entre los enterocitos y dirigidos al lumen y hacia la lámina propia (15). Su localización les confiere una función relevante en el control de la respuesta inmune tanto defensiva frente a patógenos, como tolerogénica frente a antígenos de la flora saprofita y de la dieta (14). Los LIE tienen una función principal en la regulación del epitelio intestinal produciendo citocinas, que son moduladores de la barrera de la mucosa intestinal (16). La fracción predominante son linfocitos T  $CD3^+$  ( $T\alpha\beta^+ CD8^+ \approx 80\%$  y  $T\gamma\delta^+ \approx 10\%$ ) siendo la fracción restante linfocitos  $CD3^-$  o NK-like (14)(16)(17).

En la EC hay un porcentaje aumentado de los LIE T  $\gamma\delta^+$  además de una disminución de la fracción o NK-like en los pacientes con EC al diagnóstico. El aumento en los niveles de LIE T  $\gamma\delta^+$  se mantienen incluso cuando existe remisión clínica tras la dieta sin gluten (15)(17)(18).

#### **1.6 Diagnóstico**

El criterio diagnóstico actual, está basado en una clínica compatible (diarrea y malabsorción), positividad para el gen HLA-DQ2 y/o HLA-DQ8, daño intestinal, atrofia de las vellosidades intestinales y una respuesta clínica a la dieta sin gluten. Esto ayuda a identificar a los clínicos los subtipos de esta enfermedad: EC seronegativa (ausencia del anticuerpo), EC potencial (ausencia del daño intestinal sin atrofia de las vellosidades intestinales), EC no clásica (ausencia de diarrea y malabsorción) y enfermedad celiaca no respondedora (no hay respuesta clínica a la DSG) (2).



En el diagnóstico de la EC, principalmente se hacen biopsias duodenales, lo cual es la más precisa, aunque también se están haciendo test serológicos específicos como son anticuerpos contra la transglutaminasa tisular (TG-t), anticuerpos anti-endomisio (AEM), así como la determinación de anticuerpos de péptidos desamidados de gliadina (2). No hay sin embargo un test que provea una sensibilidad y especificidad del 100%, requiriendo una biopsia duodenal como clave para el diagnóstico (2)(3)(8).

En este contexto, en 1992 el Profesor Michael Marsh clasificó las biopsias duodenales en función de los cambios anatomopatológicos que se observan en la EC. La clasificación comprende: biopsias prácticamente normales (estadio 0), biopsias que sólo presentan un incremento del infiltrado linfocitario intraepitelial (estadio 1); hiperplasia de las criptas compensadora, acompañada de inflamación crónica en la lámina propia (estadio 2), y atrofia de las vellosidades intestinales (estadio 3), que a su vez se subdivide, según su intensidad, en leve (3a), moderada (3b) o intensa (3c) y una situación de hipoplasia mucosa y submucosa total (estadio 4) (3)(4). Alrededor de un 5% de los pacientes con EC pueden llegar a desarrollar una forma denominada refractaria, en la que, a pesar de seguir una dieta sin gluten de forma estricta, tanto los síntomas como la atrofia de las vellosidades intestinales persiste (3).

En ocasiones, la EC se diagnostica en el curso de una endoscopia digestiva alta indicada por otros motivos, tales como síntomas de reflujo gastroesofágico o anemia crónica de origen no filiado, y por ello se recomienda la toma de biopsias duodenales múltiples ante su sospecha, para poder confirmar la enfermedad y evitar así tener que repetir la prueba (3).

El reconocimiento de los cambios en los LIE en la mucosa intestinal puede constituir una herramienta útil para el diagnóstico de la EC, en especial de las poblaciones de NK-like y de  $T\gamma\delta^+$  (17). Es más, las directrices ESPGHAN (Sociedad Pediátrica Europea de Pediatría, Gastroenterología, Hepatología y Nutrición) indican que se debe de buscar un alto conteo de LIE  $T\gamma\delta^+$  antes de establecer el diagnóstico de EC en el caso de que haya lesiones histológicas (19).

### 1.7 Linfograma

El aumento de los linfocitos  $T\text{CD}3^+$  ( $\alpha\beta^+$  y  $\gamma\delta^+$ ) constituye la primera anomalía detectable en la EC debido a una linfocitosis histopatológica, parámetro sensible pero no específico de EC. Este aumento se produce durante las fases activas de la enfermedad y se corrige al excluir el gluten de la dieta. Una segunda anomalía, es el aumento permanente de los LIE  $T\gamma\delta^+$ , independientemente de la ingestión o no de gluten. La tercera anomalía llamativa es la desaparición casi total de la subpoblación  $\text{CD}3^-\text{CD}7^+$  o NK-like en la EC activa. El análisis por citometría de flujo, de forma conjunta, de estos 3 parámetros: a) el porcentaje de LIE totales ( $\text{CD}45^+$ ) respecto al total del epitelio; b) el porcentaje de LIE  $T\gamma\delta^+$  y c) el porcentaje de LIE  $\text{CD}3^-$ , es lo que se denomina "linfograma intraepitelial o linfograma LIE", de alto valor diagnóstico en la práctica clínica (14)(18)(20).

Por todo ello, la determinación de la ratio de linfocitos  $T\gamma\delta^+$  y NK-like por citometría de flujo en biopsias intestinales es un marcador útil para el diagnóstico de la EC(18). El linfograma ayuda al diagnóstico de presentaciones atípicas de la enfermedad (18).

El linfograma LIE tiene una gran eficacia diagnóstica, porque dota de especificidad en el diagnóstico diferencial, identifica la forma potencial de EC, ratifica la EC en pacientes de larga evolución con DSG, pero con dudas diagnósticas y elimina interferencias de interpretación en las lesiones parcheadas, ya que el perfil del linfograma se reproduce tanto en bulbo como en duodeno distal. Finalmente, el linfograma permite caracterizar fenotípicamente la subpoblación LIE  $\text{CD}3^-$  pero con  $\text{CD}3$  intracelular que define a la población aberrante expandida en la EC refractaria tipo II (14)(20).

La citometría de flujo presenta además ventajas respecto a otras técnicas como la inmunohistoquímica, al ser rápida, objetiva y permitir la realización de marcados múltiples. Es una técnica reproducible, con la que se obtienen linfogramas similares y estables en el tiempo en un mismo paciente, a pesar de no proceder exactamente de la misma localización (18).

El linfograma de LIE puede contribuir a el diagnóstico diferencial con otras enteropatías que muestran atrofia de las vellosidades y con incremento del número de LIE, así como proporcionar información complementaria cuando los resultados de la biopsia son equívocos (21).

### **1.8 Hipótesis**

En base a todo lo anteriormente expuesto, en este trabajo nos planteamos la siguiente hipótesis:

Las diferentes subpoblaciones de LIE de la mucosa intestinal presentan variaciones para la expresión de NKG2D y el receptor de la IL-15, y a su vez pueden variar entre controles y pacientes EC.

### **1.9 Objetivos**

- Caracterizar el fenotipo y la función de los LIE, con especial atención al eje de la IL-15 y la actividad citotóxica NKG2D, ya que se sabe que la EC cursa con un aumento de linfocitos  $T\gamma\delta^+$  y disminución de NK-like, pero se desconoce la función que tienen.
- Poner a punto un modelo de estimulación de los LIE para realizar ensayos funcionales caracterizar en profundidad su función.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 Obtención de muestras común

La toma de muestras fue consentida de forma escrita por cada uno de los pacientes en el contexto de la aprobación del Comité Ético de Investigación con medicamentos (CEIm) del Área de Salud de Valladolid Este (PI\_19-1352). En todos los casos, se obtuvieron biopsias intestinales mediante gastroscopia en el Servicio del Aparato Digestivo del Hospital Clínico Universitario de Valladolid y en el Servicio del Aparato Digestivo del Hospital Universitario Río Hortega de Valladolid. De cada paciente se obtuvieron biopsias duodenales durante práctica clínica rutinaria tanto para diagnosticar como para realizar el seguimiento de la enfermedad de los pacientes.

Las biopsias se mantuvieron en RPMI a 4°C hasta su traslado al laboratorio. Parte de las muestras fueron criopreservadas a -80 °C en medio de congelación previamente a su uso.

### 2.2 Demografía y pacientes a estudio

#### ➤ Linfograma

Las poblaciones a estudio fueron cuatro: a) Pacientes sanos sin EC ni inflamación intestinal, b) Pacientes con EC con DSG, c) Pacientes con inflamación intestinal inespecífica no celiaca, y d) Pacientes con EC activa (es decir, con inflamación intestinal).

En total se reclutaron 42 pacientes: 19 individuos sin EC ni inflamación intestinal (11 mujeres, edad media  $41 \pm 15,27$  años), 6 individuos con EC con dieta libre de gluten (5 mujeres, edad media  $39 \pm 9,84$  años), 7 pacientes con inflamación sanos (4 mujeres, edad media  $41 \pm 14,04$  años) y 10 pacientes con EC activa (7 mujeres, edad media  $44 \pm 16,43$  años).

#### ➤ Cultivos

La población a estudio fueron 11 controles sin EC ni inflamación (7 mujeres, edad media  $36 \pm 18,34$  años).

### 2.3 Reactivos

Tabla 1

Reactivo	Marca	Concentración stock
RPMI: Medio completo de cultivo Roswell Park Memorial	Gibco	1X
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Gibco	1X
AIM-V®: Serum Free medium	Gibco	1X
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Cytiva Hyclone	
Bovine Serum Albumin (BSA) Fraction V Ig free	Gibco	
DTT: Ditioneitol	Sigma-Aldrich	sólido
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético	Sigma-Aldrich	Sólido o líquido 0,5 M

Penicilina/ Estreptomina	Gibco	10.000 unidades /ml penicilina 10.000 µg/ml estreptomina
Gentamicina	Gibco	50mg/ml
Azida sódica	Sigma-Aldrich	
FBS: Suero fetal bovino	Gibco	
EDTA Ultrapuro líquido	Invitrogen	0,5 M
Reactivo A: FIX & PERM MEDIUM A	Life Technologies	
Reactivo B: FIX & PERM MEDIUM B	Life Technologies	
Azul de tripano	BioWhittaker	
Paraformaldehído	Protocol	10%
DMSO: dimetilsulfoxido	MP Biomedicals	
Monensina	BioLegend	1000 X
Human BD Fc-Block	BD Biosciences	0,5 mg/ml
αCD3	Biolegend	Concentración 1mg/ml
αCD28	Biolegend	Concentración 1 mg/ml
Microbeads magnéticas CD45 humanas	Miltenyibiotec	

## 2.4 Soluciones preparadas a partir reactivos

**Tabla 2**

<b>Solución</b>	<b>Preparación y concentración final</b>
FACS buffer	1 mM EDTA y 0.02% azida sódico en DPBS.
MACS buffer	2 mM EDTA en DPBS con 0,5% BSA.
DTT/ EDTA	1mM DTT y 1mM solución de EDTA en RPMI.
Solución con αCD3	Se disuelve αCD3 madre en PBS quedando αCD3 a 5 µg/ml
Medio de cultivo	Disolución de penicilina 100 U/ml, 0'15 mg/ml de Estreptomina, y 60 µg/ml gentamicina disuelto en AIMV.
Medio de congelación	Contiene 90% FSB y 10% DMSO.

Medio de cultivo con estímulo	A partir de la disolución de medio de cultivo se disuelve $\alpha$ CD28 quedando con una concentración de 1mg/ ml.
Paraformaldehído 2%	Dilución de paraformaldehído al 10% con FACS buffer.
Monensina 100x	Dilución de monensina madre a 1000X en AIMV.
Medio de congelación	Contiene 90% FSB y 10% DMSO.

## 2.5 Material

**Tabla 3**

Material	Marca
Parafilm	Pechiney plastic packacking
Pipetas Pasteur	Fisherbrand
Micropipetas	Gilson
Tubos Falcon-15 ml	Corning
Tubos Falcon- 50 ml	Corning
Tubos Falcon- 50 ml	Corning
Tubos citometría 5 mL polipropileno	Falcon-A Corning Brand
Placa Petri	Corning
Mallas de 100 $\mu$ m	Fisherbrand
Crioviales	Fisherbrand
Puntas pipetas	Fisherbrand
Tarteras de congelación	CoolCell® LX de Corning
Placa 96 pocillos de superficie plana de cultivo	Flat delta Surface

## 2.6 Equipamiento

**Tabla 4**

Equipamiento	Marca
Centrífuga GT 2R	Fischer Scientific
Agitador Orbital MaxQ 4450	Thermo Scientific
Citómetro	Gallios, Beckman Coulter, 3 láseres y 10 detectores

Campana de extracción	Thermo Scientific MSC Advantage 1.2
Baño Térmico	Wendigen w6

## 2.7 Procesamiento de las muestras biológicas .

### ➤ Obtención de LIE

Partiendo de las muestras conservadas en criotubos a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se descongelaron en un baño a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 segundos. Con la ayuda de una pipeta Pasteur, se depositaron las biopsias sobre una placa de Petri con HBSS. Posteriormente se pasaron todas las biopsias a un tubo de 15 ml con 5 ml de DTT/EDTA. Tras dos incubaciones de 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  y 250 revoluciones por minuto (rpm) el sobrenadante fue filtrado en con una malla de  $100\text{ }\mu\text{m}$  y posteriormente centrifugado (1500 rpm, 10 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

### ➤ Tinción extracelular

Las células se resuspendieron en 1 ml de FACS buffer y se pasaron a un tubo de citometría. Posteriormente se tiñó con  $0,5\text{ }\mu\text{l}$  de marcador de viabilidad , durante 30 segundos. Después se centrifugaron (1500 rpm, 5 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y se descartó el sobrenadante.

Seguidamente se añadió Fc-Block (dilución 1:50) incubándose durante 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Esto se realiza para bloquear las uniones inespecíficas de los anticuerpos.

Las células se lavaron con 1 ml de FACS-Buffer y se centrifugaron (1500 rpm, 10 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en  $100\text{ }\mu\text{l}$  del mix de tinción extracelular (ver panel tinción extracelular linfograma, tabla 5 ) dejándolo incubar 20 min, en oscuridad a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

A continuación, se añadió 1 ml de FACS-Buffer y se lavó (1500 rpm, 10 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Tras retirar el sobrenadante, se resuspendió en  $250\text{ }\mu\text{l}$  de paraformaldehído al 2%. Se incubaron durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$  en oscuridad. Una vez pasado este tiempo se lavaron con 1ml de FACS-buffer y se centrifugaron (1500 rpm, 10 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Por último, se resuspendieron en  $500\text{ }\mu\text{l}$  de FACS-buffer hasta proceder a la adquisición del citómetro.

**Tabla 5- Tinción extracelular linfograma**

Dilución	Fluorocromo	Marcador	Compañía	Clon
50	FITC	$\text{T}\gamma\delta$	BD	B1
50	PE	IL15Ra	BioLegend	JM7A4
50	PEdazzle594	NKG2d	BioLegend	1D11
50	PerCP-Cy5.5	IL2RB	BioLegend	TU27
800	PE-Cy7	CD45	BD	HI30 (RUO)
400	APC	CD3	BioLegend	HIT3a
100	Alexa700	CD8	BD	RPA-T8
800	BV421	CD7	BD	M-T701
200	BV510	CD4	BD	SK3

**Tabla 6- tinción extracelular cultivo**

Dilución	Fluorocromo	Marcador	Compañía	Clon
50	BV510	CD3	BDHorizon	HIT3a
FACSBuffer				

➤ **Aislamiento LIE**

Los IEL fueron enriquecidos mediante separación magnética con microbeads magnéticas CD45 humanas.

El procedimiento de obtención de los IEL es igual que en la tinción extracelular. Una vez que se ha procedido a la segunda incubación en el agitador, se centrifugó, se retiró el sobrenadante y se añadió 1 ml de RPMI. A continuación, se procedió al conteo con Azul de Tripano (dilución 1:10), se centrifugó (1500 rpm, 10 min, 4 °C) y se retiró el sobrenadante. Las células se resuspendieron en MACS Buffer y se añadieron las microbeads magnéticas αCD45 (dilución 1:5). Tras una incubación de 15 min a 4 °C se añadió 1ml de MACs buffer y se centrifugó de nuevo (1500 rpm, 10 min, 4 °C). Las células se resuspendieron en 500µl de MACS Buffer. Las células unidas a las microbeads magnéticas se pasaron por columnas unidas a un imán magnético dos veces. Una vez terminado este proceso se centrifugó (1500 rpm, 10 min, 4 °C). Se añadió 1 ml RPMI y de nuevo se realizó el conteo celular.

➤ **Cultivo IEL**

Se emplearon placas 96 pocillos de fondo plano, tratadas 12h antes del cultivo con 100 µl de solución de αCD3. Las placas se sellaron con Parafilm y se dejaron en la cámara frigorífica a 4 °C.

Para el cultivo, las células fueron suspendidas en 100 µl de medio de cultivo o medio con estímulo según correspondiera a una concentración de 10<sup>6</sup> células/ml durante 24h a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Las últimas 4 horas se añadió monensina (1X) a cada pocillo y se recogió en tubos de citometría. Tras 4h a 37 °C se procedió a la tinción intra y extracelular. Para ello, se añadió 1 ml de FACS-Buffer. Posteriormente se realizó la tinción extracelular como se ha indicado anteriormente( panel tinción extracelular cultivo, tabla 6), pero antes de fijar con paraformaldehído se realiza una tinción intracelular. Para detener la tinción se lavó con 1ml de FACS- Buffer. Una vez retirado el sobrenadante, se produjo la suspensión de las células en 100 µl de Reactivo A. Se dejó incubar durante 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad. A continuación, se añadió 1 ml de FACS buffer y se centrifugó (1500 rpm, 10 min, 4 °C). Se resuspendieron las células en el mix de tinción intracelular (panel tinción intracelular cultivo-tabla 7), dejándolo incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Una vez pasado el tiempo, se lavaron con 1ml de FACS-Buffer y se centrifugaron las células (1500 rpm, 10 min, 4 °C), tras retirar el sobrenadante en PF 2% incubándolo durante 10 min en oscuridad a 4 °C. Por último, se añadió 1 ml de FACS-buffer y se centrifugó (1500 rpm, 10 min, 4 °C). El sobrenadante se retiró y se resupendió en 500 µl de FACS-Buffer, dejándolo preservar a 4 °C hasta la adquisición en el citómetro.

**Tabla 7- tinción intracelular cultivo**

Dilución	Fluorocromo	Marcador	Compañía	Clon
50	PE	IFN-γ	BDPharmingén	XMG1.2
50	APC	TNF-α	Biologend	MAb11
Reagente B FIX & PERM MEDIUM B		Life Technologies		

## **2.8 Citometría de flujo**

Las células fueron adquiridas (tanto tinción extracelular como intracelular) en el citómetro de flujo Gallios , Beckman Coulter. Se construyó un panel multicolor para el análisis fenotípico y funcional de linfocitos intraepiteliales. Los análisis posteriores se realizaron mediante el software FlowJo.

## **2.9 Tratamiento estadístico**

Los datos fueron analizados con el software GrapPad Prism 9. Se aplicaron tests paramétricos como t-student o ANOVA para comparaciones múltiples. En el caso de las comparaciones múltiples para cada marcador en cada población, el análisis ad-hoc se realizó comparando los resultados con los de la respectiva subpoblación en los controles sanos. En las muestras pareadas (por ejemplo, expresión de un marcador en diferentes poblaciones de el mismo individuo) se aplicó una estadística pareada. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas comparaciones con un p-valor < 0,05 (\* p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001).



### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Identificación de LIE, $T\gamma\delta^+$ , T clásicos y NK-like

Con el objetivo de determinar de manera precisa las poblaciones de LIE, se realizaron una serie de acotaciones llamadas *gatings* como se ilustra en la Figura 1. La secuencia de dichos *gatings* para la identificación de es la siguiente. El total de LIE se identifica dentro de las células singletes, viables (viabilidad<sup>-</sup>) como leucocitos ( $CD45^+$ ). Posteriormente, se identifican los linfocitos  $T\gamma\delta^+$  ( $T\gamma\delta^+CD3^+$ ), los linfocitos T clásicos ( $T\gamma\delta^-CD3^+$ ) y los linfocitos NK-Like ( $CD3^-$ ). Los linfocitos NK-Like se dividen a su vez en la fracción  $CD7^+$  y  $CD7^-$ , estudiándose la presencia de CD8 ( $CD8^+CD4^-$ ) y dobles negativas ( $CD8^-CD4^-$ ). Por su parte, también se estudió la expresión de los marcadores CD4 y CD8 en los linfocitos T clásicos y en los  $T\gamma\delta^+$ , lo que le permite clasificar a los linfocitos  $T\gamma\delta^+$  en CD8 ( $CD8^+CD4^-$ ), dobles positivos ( $CD8^+CD4^+$ ) y dobles negativos ( $CD8^-CD4^-$ ). Por su parte, los linfocitos T clásicos se pueden diferenciar en CD4 ( $CD8^-CD4^+$ ), CD8 ( $CD8^+CD4^-$ ), dobles positivos ( $CD8^+CD4^+$ ) y dobles negativos ( $CD8^-CD4^-$ ).

#### 3.2 Ejemplos estrategia de identificación de NKG2D, IL-15R $\alpha$ e IL-2R $\beta$

Una vez identificadas las diferentes subpoblaciones de LIE (Figura 1), se procedió a evaluar la expresión de NKG2D, el receptor  $\alpha$  de la ( IL-15R $\alpha$ ) y receptor  $\beta$  de IL-2 ( IL-2R $\beta$ ) en cada una de ellas. En la Figura 2, se observa la estrategia de identificación para determinar el porcentaje de células positivas para la expresión NKG2D, IL-15R $\alpha$  y de IL-2R $\beta$  para linfocitos T clásicos en poblaciones CD4 y CD8, así, como para linfocitos NK-Like en la fracción CD8. Se puede comprobar como en la subpoblación  $T\gamma\delta^-CD3^+CD8^+CD4^-$  hay expresión de NKG2D, mientras que en  $T\gamma\delta^-CD3^+CD8^-CD4^+$  o en  $CD3^-CD7^-CD8^+$  no existe expresión. En el caso de IL-15 R $\alpha$  y de IL-12R $\beta$ , en la subpoblación  $T\gamma\delta^-CD3^+CD8^+CD4^-$  hay expresión de IL-2R $\beta$  y de IL-15R $\alpha$ , así como expresión del receptor funcional IL-15 R $\alpha$ /2 R $\beta$ , mientras que en la subpoblación  $CD3^-CD7^-CD8^+$  no hay expresión

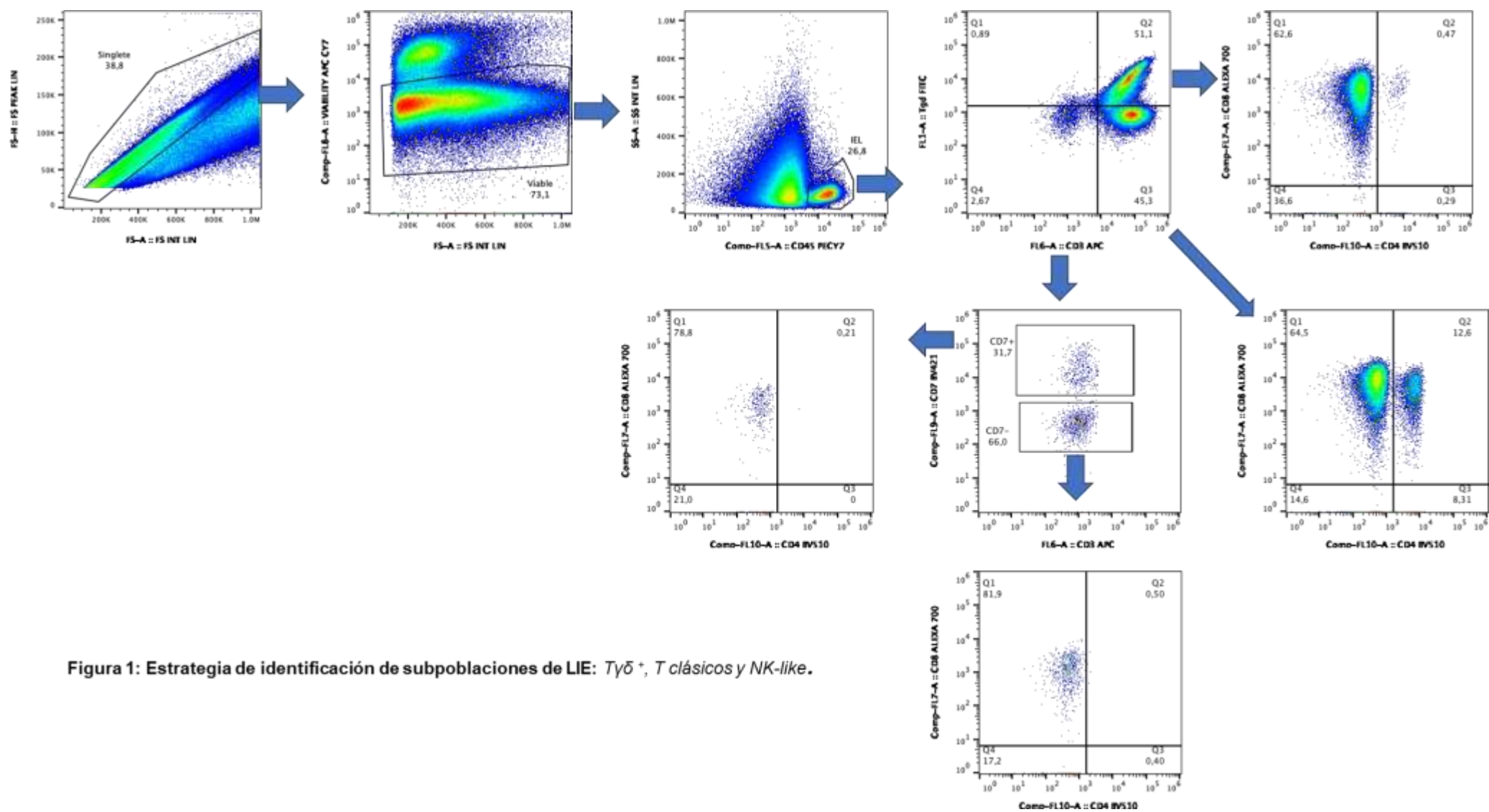


Figura 1: Estrategia de identificación de subpoblaciones de LIE:  $T\gamma\delta^+$ ,  $T$  clásicos y  $NK$ -like.

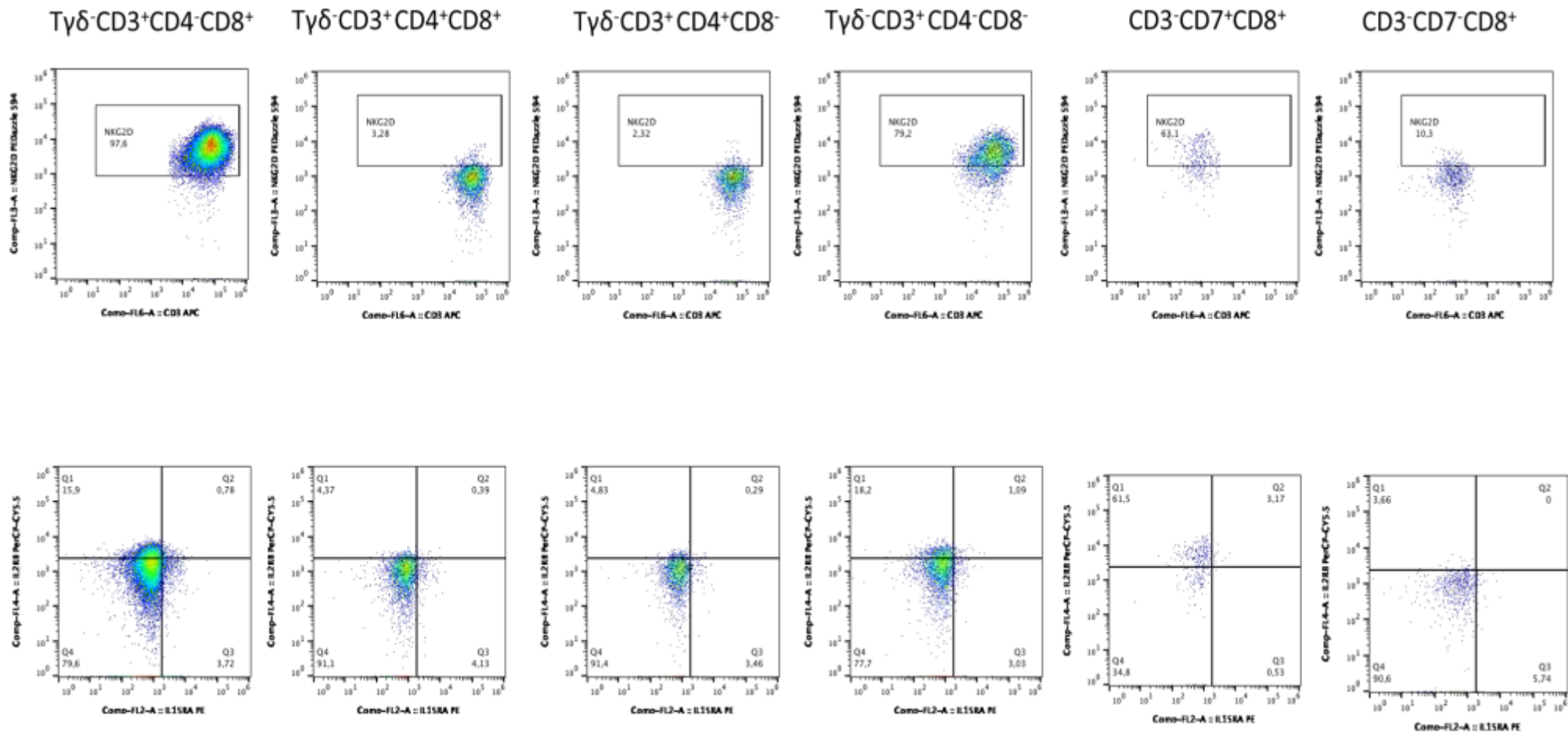


Figura 2: Estrategia de identificación de NKGD2, IL-15R $\alpha$  e IL2-R $\beta$  Figura para *T* clásicos y *NK-like*.

### ➤ **Expresión NKG2D en las subpoblaciones de LIES**

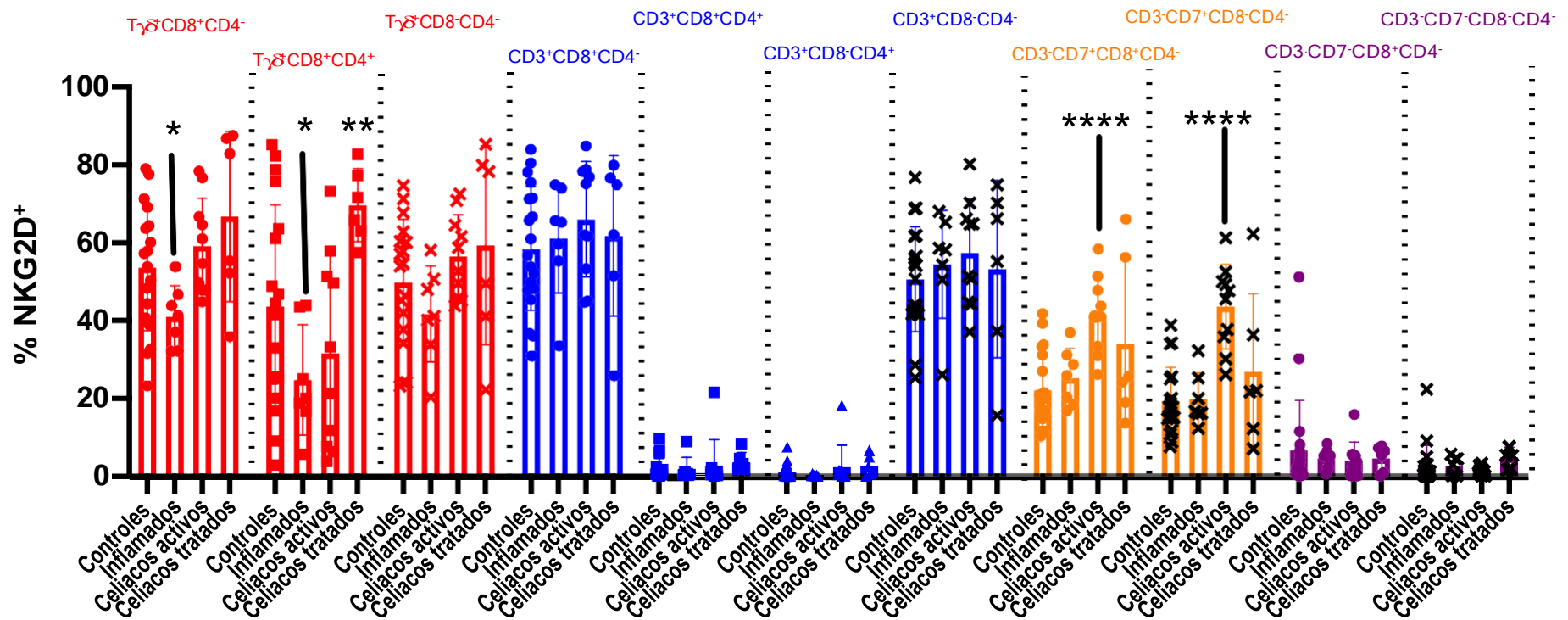
Tras identificar las diferentes subpoblaciones de LIE en cada uno de los 4 grupos a estudio siguiendo las directrices de la Figura 1, se procedió a identificar la expresión de NKG2D en cada una de ellas como se detalló en la Figura 2. Los resultados de la expresión de NKG2D en cada subpoblación y cada grupo a estudio se representan en la Figura 3.

NKG2D se expresa sobre todo en la subpoblación  $T\gamma\delta^+$ , tanto en la población CD8, los dobles positivos y los dobles negativos, además de en las subpoblaciones de linfocitos T clásicos CD8 ( $CD8^+CD4^-$ ) y linfocitos T clásicos dobles negativos ( $CD8^-CD4^-$ ) y en las subpoblaciones NK-like tanto  $CD3^-CD7^+CD8^+CD4^-$  como  $CD3^-CD7^+CD8^-CD4^-$ .

Dentro de la subpoblación  $T\gamma\delta^+CD8^+CD4^-$ , la expresión de NKG2D está aumentada en los pacientes con EC tratados con respecto a los controles. En la subpoblación  $T\gamma\delta^+CD8^+CD4^+$ , NKG2D se expresa especialmente en los pacientes con EC tratados comparada con la de controles. En la subpoblación  $T\gamma\delta^+CD8^-CD4^-$  hay una mayor expresión de NKG2D en pacientes con EC tratados con respecto a controles sanos.

Para la subpoblación de linfocitos T clásicos  $CD3^+CD8^+CD4^-$  la mayor expresión de NKG2D se observa en el grupo de estudio de pacientes con EC activos. En el caso de la subpoblación  $CD3^+CD8^-CD4^-$  NKG2D se expresa sobre todo en pacientes con EC activos.

La expresión de NKG2D en la subpoblación  $CD3^-CD7^+CD8^+CD4^-$  esta aumentado en los pacientes con EC activa . Por último, cabe señalar, que en la subpoblación  $CD3^-CD7^+CD8^-CD4^-$ , NKG2D se expresa sobre todo en los pacientes con EC activa.



**Figura 3 : Porcentaje de expresión de NKG2D en los grupos a estudio .** Se muestran los distintos porcentajes para linfocitos T $\gamma\delta^+$ , linfocitos T clásicos y para NK-like. Dentro de los T $\gamma\delta^+$  en CD8 (CD8 $^+$ CD4 $^-$ ), dobles positivos (CD8 $^+$ CD4 $^+$ ) y dobles negativos (CD8 $^-$ CD4 $^-$ ), para los linfocitos T clásicos se pueden diferenciar en CD4 (CD8 $^-$ CD4 $^+$ ), CD8 (CD8 $^+$ CD4 $^-$ ), dobles positivos (CD8 $^+$ CD4 $^+$ ) y dobles negativos (CD8 $^-$ CD4 $^-$ ) y los NK-like se dividen a su vez en la fracción CD7 $^+$  CD7 $^-$ , estudiándose a su vez la presencia de CD8 (CD8 $^+$ CD4 $^-$ ) y dobles negativas (CD8 $^-$ CD4 $^-$ ). Se aplicó un test ANOVA con muestras repetidas, comparando *ad-hoc* los niveles de expresión en cada grupo a estudio de cada subpoblación con los niveles de expresión encontrados en los controles. Se consideró significativo un p-valor menor a 0,05 (\* p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,00010001).

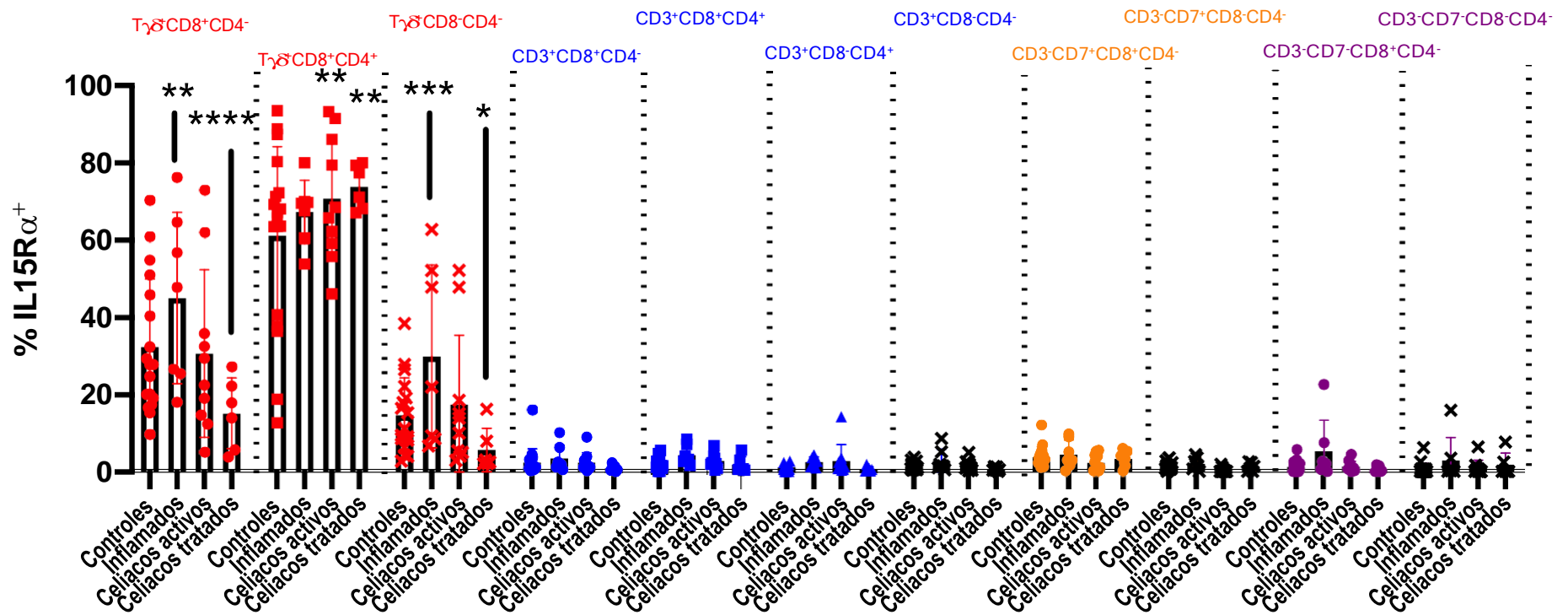
➤ **Expresión de IL-15 R $\alpha$  en las subpoblaciones de LIE**

Posteriormente, se evaluó la expresión del receptor IL-15 R $\alpha$  en cada una de las subpoblaciones a estudio identificadas en la Figura 1, siguiendo las indicaciones detalladas en la Figura 2. Los resultados para cada subpoblación en cada grupo a estudio se detallan en la Figura 4.

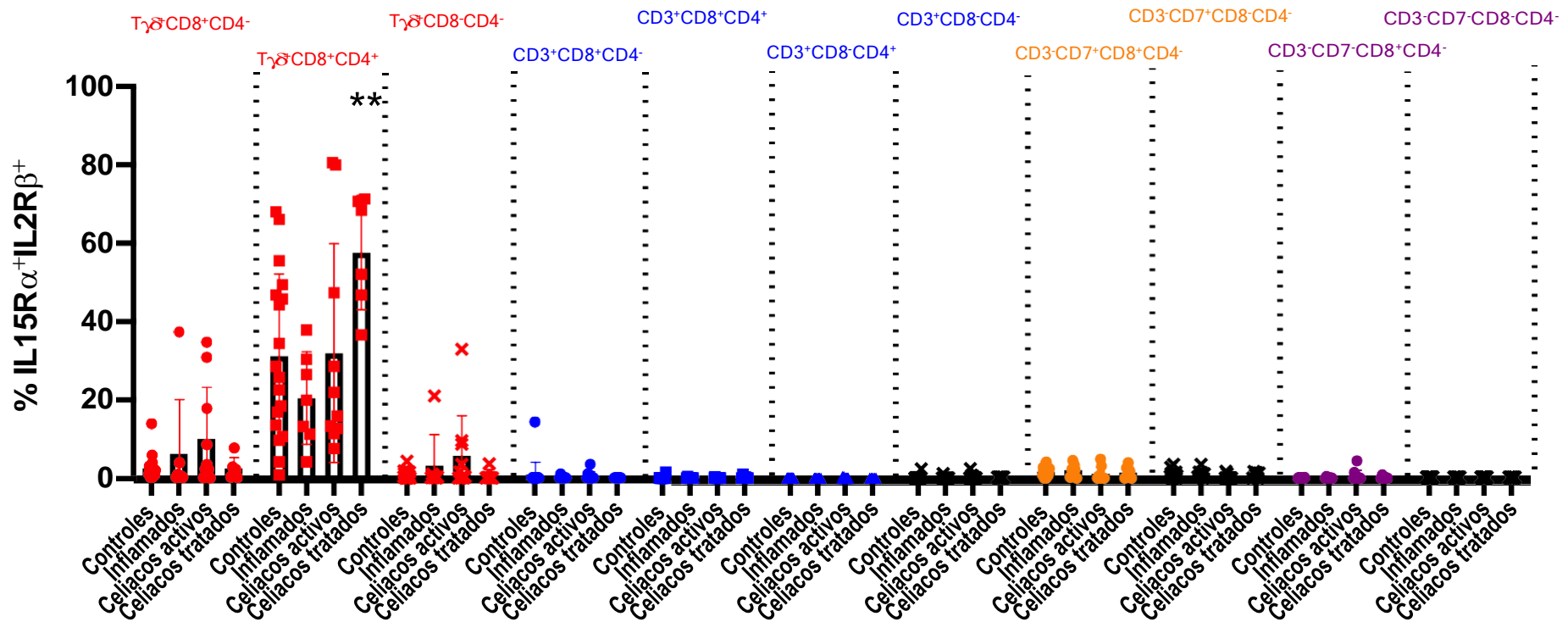
Nuestros resultados indican que el receptor IL-15 R $\alpha$  se expresa prácticamente de forma exclusiva y específica en los linfocitos T $\gamma\delta^+$ , con una expresión mínima en las demás subpoblaciones. En la subpoblación T $\gamma\delta^+$  CD8 $^+$ CD4 $^-$ , IL-15 R $\alpha$  se expresa más en el grupo de estudio de los controles inflamados. En la subpoblación T $\gamma\delta^+$ CD8 $^+$ CD4 $^+$ , la expresión de IL-15 R $\alpha$  está aumentada en los pacientes con EC tratados con respecto a los controles, mientras que en la subpoblación T $\gamma\delta^+$ CD8 $^-$ CD4 $^-$  la expresión está aumentada en los controles inflamados.

➤ **Expresión de IL-15 R $\alpha$ /IL-2 R $\beta$  en las subpoblaciones de LIE**

Sin embargo, el receptor de la IL-15 es un receptor particular y puede funcionar como un decoceptor. Por eso es importante estudiarlo en el contexto de la cadena  $\beta$  de la IL-2R $\beta$  para confirmar que se trata de un receptor funcional (11)(12). Estos resultados se muestran en la Figura 5. En ella se aprecia que la expresión del receptor de IL-15 funcional se encuentra restringida a la población T $\gamma\delta^+$ CD8 $^+$ CD4 $^+$ , siendo el grupo de pacientes con EC tratados donde se expresa más.



**Figura 4 : Porcentaje de expresión de IL-15 R $\alpha$  en los grupos a estudio .** Se muestran los distintos porcentajes para linfocitos T $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, linfocitos T clásicos y para NK-like. Dentro de los T $\gamma\delta$ <sup>+</sup> en CD8 (CD8<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>), dobles positivos (CD8<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) y dobles negativos (CD8<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>), para los linfocitos T clásicos se pueden diferenciar en CD4 (CD8<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>), CD8 (CD8<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>), dobles positivos (CD8<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) y dobles negativos (CD8<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>) y los NK-like se dividen a su vez en la fracción CD7<sup>+</sup> CD7<sup>-</sup>, estudiándose a su vez la presencia de CD8 (CD8<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>) y dobles negativas (CD8<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>). Se aplicó un test ANOVA con muestras repetidas, comparando *ad-hoc* los niveles de expresión en cada grupo a estudio de cada subpoblación con los niveles de expresión encontrados en los controles. Se consideró significativo un p-valor menor a 0,05 (\* p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,00010001.)

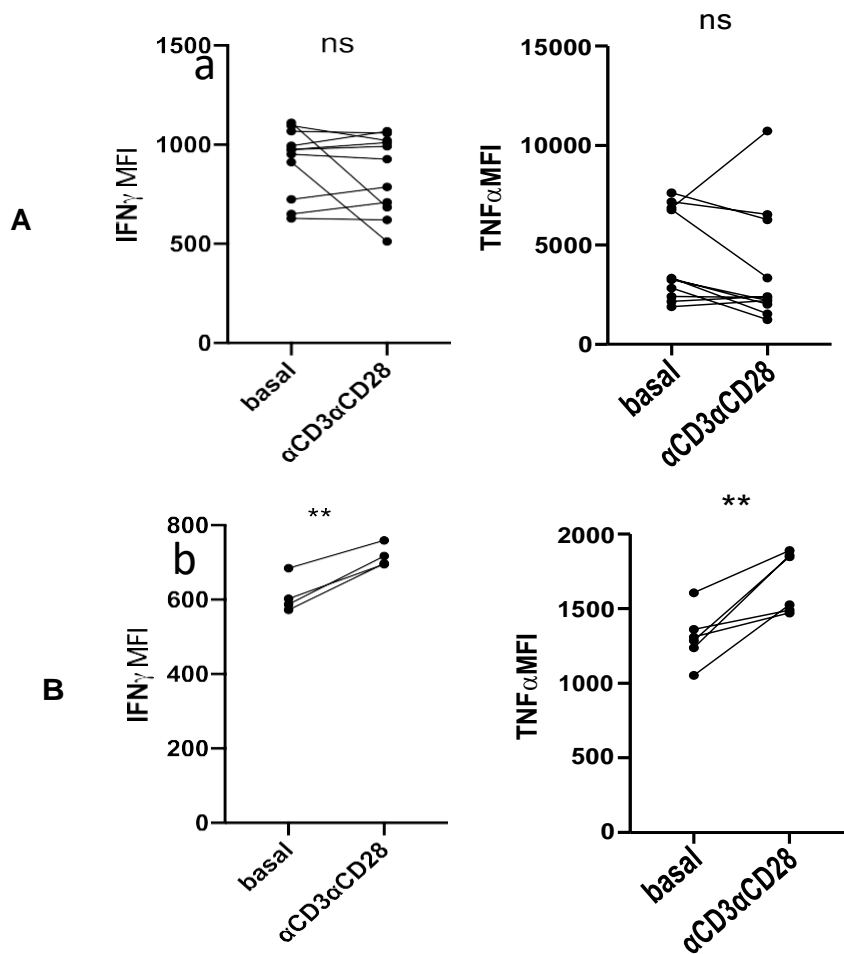


**Figura 5 : Porcentaje de expresión de IL-15 R $\alpha$ /IL-R2 $\beta$  en los grupos a estudio .** Se muestran los distintos porcentajes para linfocitos T $\gamma\delta^+$ , linfocitos T clásicos y para NK-like. Dentro de los T $\gamma\delta^+$  en CD8 (CD8 $^+$ CD4 $^-$ ), dobles positivos (CD8 $^+$ CD4 $^+$ ) y dobles negativos (CD8 $^-$ CD4 $^-$ ), para los linfocitos T clásicos se pueden diferenciar en CD4 (CD8 $^-$ CD4 $^+$ ), CD8 (CD8 $^+$ CD4 $^-$ ), dobles positivos (CD8 $^+$ CD4 $^+$ ) y dobles negativos (CD8 $^-$ CD4 $^-$ ) y los NK-like se dividen a su vez en la fracción CD7 $^+$  CD7 $^-$ , estudiándose a su vez la presencia de CD8 (CD8 $^+$ CD4 $^-$ ) y dobles negativas (CD8 $^-$ CD4 $^-$ ). Se aplicó un test ANOVA con muestras repetidas, comparando *ad-hoc* los niveles de expresión en cada grupo a estudio de cada subpoblación con los niveles de expresión encontrados en los controles. Se consideró significativo un p-valor menor a 0,05 (\* p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,00010001).



➤ **Estimulación de los LIE para realizar ensayos funcionales**

Para poner a punto este modelo de cultivo, y dado que no todas las subpoblaciones de LIE expresan un receptor funcional de IL-15 (Figura 5), el modelo lo pusimos a punto con  $\alpha$ CD3/CD28, al tratarse de un modelo de estimulación policlonal determinando la activación de los LIE como producción de  $\text{INF}\gamma$  y  $\text{TNF}\alpha$ . Sin embargo, los LIEs no respondieron al estímulo tal y como se observa en la Figura 6a. Esto podría ser debido a cuestiones biológicas (que no se trate de un buen estímulo), o que por el contrario nuestro modelo de estimulación presente algún fallo. Para confirmar esta posibilidad, realizamos los experimentos utilizando linfocitos de sangre periférica de controles sanos que sí respondieron al estímulo (Figura 6b). Estos resultados confirman que la estimulación de los LIE con  $\alpha$ CD3/CD28 no es un buen modelo por lo que los siguientes experimentos de laboratorio, se va a poner a punto la estimulación con IL-15.



**Figura 6: Producción de  $\text{INF}\gamma$  y  $\text{TNF}\alpha$  en linfocitos estimulados con  $\alpha$ CD3 y  $\alpha$ CD28.** Producción de  $\text{INF}\gamma$  y  $\text{TNF}\alpha$  en LIE (a) y linfocitos de sangre periférica (b) estimulados en presencia de  $\alpha$ CD3 y  $\alpha$ CD28. Se aplicó un t-test pareado. Se consideró significativo un p-valor menor a 0,05 (ns, no significativo; \*\*,  $p < 0,01$ ).

#### 4. DISCUSIÓN

En este estudio, hemos analizado 4 poblaciones: Individuos controles sin EC ni inflamación intestinal, Individuos con EC con dieta sin gluten y por tanto no inflamados, Individuos con inflamación intestinal inespecífica no celiaca e Individuos con EC activa, centrado nuestra atención en los LIE del compartimento duodenal:

El linfograma intraepitelial tiene utilidad diagnóstico en la EC ya que puede identificar EC activos o tratados (14)(18)(20). Con los resultados de los linfogramas, estudiamos la patogenia de la EC, las subpoblaciones que hay, así como caracterizamos la expresión de NKG2D y de IL-15R $\alpha$ /IL-2R $\beta$ .

Parece que la subpoblación NK-like y T $\gamma\delta^+$  podrían estar implicadas en lesión duodenal de los pacientes con EC, ya que la expresión de NKG2D está aumentada los EC tratados. A su vez se produce un aumento del receptor funcional IL-15R $\alpha$ /IL-2R $\beta$  con exclusividad en la subpoblación T $\gamma\delta^+$  especialmente en el grupo de estudio de EC tratados. Que no se haya detectado sin embargo un aumento del receptor funcional de la IL-15 en los EC activos, pueda ser debido a la presencia de IL-15 en el medio de forma que el receptor esté ocupado con IL-15, lo que dificultaría el reconocimiento por parte de los anticuerpos en la citometría. Otra opción es que esté sucediendo un mecanismo compensatorio al principio de la respuesta y este mecanismo está sobre activado al principio, mientras que los pacientes con dieta sin gluten estén predispuestos a empezar. Esto sugiere que el receptor funcional de IL-15 es un biomarcador y un factor de activación en la patogénesis celiaca.

Es la primera vez que se caracteriza la expresión del receptor funcional en mucosa y que por ello hace falta validar los resultados estimulando las poblaciones con IL-15. En vista de lo anterior, lo que queremos es confirmar si la estimulación con IL-15 afecta específicamente a las células que tienen los receptores funcionales y si esto se traduce en un aumento en la expresión de NKG2D.

Para ello quisimos poner a punto un modelo de estimulación de los LIE utilizando un modelo de estimulación con  $\alpha$ CD3/CD28, pero no vimos respuesta, por lo que tenemos que buscar un mejor modelo de estimulación. Para corroborar esto, debemos realizar ensayos de estimulación con IL-15 y con gliadina en LIE, para ver que subpoblaciones de LIE responden y se activan en controles y en pacientes EC. Esto permitirá confirmar no sólo la funcionalidad de receptor de la IL-15 al estimular con IL-15, sino también identificar las poblaciones que responden a un estímulo con gliadina, aquellas que modula la expresión de NKG2D y, en definitiva, profundizar en la patogénesis de la EC.

Por otra parte, el hecho de que NKG2D se exprese en la subpoblación NK-like, en el grupo de estudio de los pacientes con EC activos, pese a que no presentan un receptor funcional IL-15, sugiere que esta activación en esta población es independiente de IL-15 o, alternativamente, existe un mediador intermedio tras la estimulación con IL-15 que induce la expresión.

## **5. CONCLUSIONES**

Para finalizar, se puede afirmar que los objetivos propuestos en este estudio se han cumplido, al menos parcialmente, quedando pendiente de implementar un modelo de estimulación de los LIE. Todo ello abre una puerta a seguir ampliando la investigación en la EC, realizando una caracterización fenotípica y funcional de los LIE en muestras duodenales.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Arranz E, Garrote JA. Inmunología de la enfermedad celíaca. *Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2010 Nov;33(9):643-51. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0210570509005524>
2. Caio G, Volta U, Sapone A, Leffler DA, De Giorgio R, Catassi C, et al. Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Med* [Internet]. 2019 Dec 23;17(1):142. Available from: <https://bmcmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-019-1380-z>
3. Rodrigo L, Garrote JA, Vivas S. Enfermedad celíaca. *Med Clin (Barc)* [Internet]. 2008 Sep;131(7):264-70. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025775308722474>
4. Catassi C, Fasano A. Celiac Disease Diagnosis: Simple Rules Are Better Than Complicated Algorithms. *Am J Med* [Internet]. 2010 Aug;123(8):691-3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjmed.2010.02.019>
5. Vaquero L, Bernardo D, León F, Rodríguez-Martín L, Alvarez-Cuenllas B, Vivas S. Challenges to drug discovery for celiac disease and approaches to overcome them. *Expert Opin Drug Discov* [Internet]. 2019 Oct 3;14(10):957-68. Available from: <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1642321>
6. Chibbar R, Dieleman LA. The gut microbiota in celiac disease and probiotics. *Nutrients*. 2019;11(10).
7. Olivares M, Neef A, Castillejo G, Palma G De, Varea V, Capilla A, et al. The HLA-DQ2 genotype selects for early intestinal microbiota composition in infants at high risk of developing coeliac disease. *Gut* [Internet]. 2015 Mar;64(3):406-17. Available from: <https://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2014-306931>
8. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PHR, et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut* [Internet]. 2013 Jan;62(1):43-52. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
9. Bernardo D, Garrote JA, Allegretti Y, León A, Gómez E, Bermejo-Martin JF, et al. Higher constitutive IL15R $\alpha$  expression and lower IL-15 response threshold in coeliac disease patients. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2008 Oct;154(1):64-73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18821940>
10. Caillat-Zucman S. How NKG2D Ligands Trigger Autoimmunity? *Hum Immunol* [Internet]. 2006 Mar;67(3):204-7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0198885906000346>
11. Abadie V, Jabri B. IL-15: a central regulator of celiac disease immunopathology. *Immunol Rev* [Internet]. 2014 Jul;260(1):221-34. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/imr.12191>
12. Allard-Chamard H, Mishra HK, Nandi M, Mayhue M, Menendez A, Ilangumaran

- S, et al. Interleukin-15 in autoimmunity. *Cytokine* [Internet]. 2020 Dec;136(August):155258. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S104346662030274X>
13. Hüe S, Mention J-J, Monteiro RC, Zhang S, Cellier C, Schmitz J, et al. A Direct Role for NKG2D/MICA Interaction in Villous Atrophy during Celiac Disease. *Immunity* [Internet]. 2004 Sep;21(3):367-77. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761304002122>
  14. Carlota García-Hoz y Garbiñe Roy. *Gastroenterología y Hepatología. Gastroenterol Hepatol*. 2016;39(xxxx):25-6.
  15. Camarero C, Eiras P, Asensio A, Leon F, Olivares F, Escobar H, et al. Intraepithelial lymphocytes and coeliac disease: permanent changes in CD3-/CD7+ and T cell receptor  $\gamma\beta$  subsets studied by flow cytometry. *Acta Paediatr* [Internet]. 2000 Mar;89(3):285-90. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1651-2227.2000.tb01330.x>
  16. Qiu Y, Yang H. Effects of intraepithelial lymphocyte-derived cytokines on intestinal mucosal barrier function. *J Interf Cytokine Res*. 2013;33(10):551-62.
  17. Saborido R, Martínón N, Regueiro A, Crujeiras V, Eiras P, Leis R. Intraepithelial lymphocyte immunophenotype: a useful tool in the diagnosis of celiac disease. *J Physiol Biochem* [Internet]. 2018 Feb 16;74(1):153-8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13105-017-0586-9>.
  18. Olivencia Palomar P, Ruiz AC, Scapa MÁM, Prieto FL, Ariño GR, Verge CR. Enfermedad celíaca del adulto y linfocitos intraepiteliales. ¿Nuevas opciones para el diagnóstico? *Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2008;31(9):555-9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1157/13128293>.
  19. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2012 Jan;54(1):136-60. Available from: <https://journals.lww.com/00005176-201201000-00028>
  20. Fernández-Bañares F, Carrasco A, García-Puig R, Rosinach M, González C, Alsina M, et al. Intestinal Intraepithelial Lymphocyte Cytometric Pattern Is More Accurate than Subepithelial Deposits of Anti-Tissue Transglutaminase IgA for the Diagnosis of Celiac Disease in Lymphocytic Enteritis. D'Auria S, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 Jul 10;9(7): e101249. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0101249>
  21. Camarero C, Leon F, Sanchez L, Asensio A, Roy G. Age-related variation of intraepithelial lymphocytes subsets in normal human duodenal mucosa. *Dig Dis Sci*. 2007;52(3):685-91.