

**EDGARDO CARLOS KOLKOWSKI**

**LINFOCITOS INTRAEPITELIALES  
EN LA  
ENFERMEDAD CELIACA**



Universitat Autònoma de Barcelona

**EDGARDO CARLOS KOLKOWSKI**

**LINFOCITOS INTRAEPITELIALES  
EN LA  
ENFERMEDAD CELIACA**

Memoria de la Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias  
Biológicas por la Universitat Autònoma de Barcelona

26 de noviembre del 2004,  
Barcelona, España

**EDGARDO CARLOS KOLKOWSKI**

**LINFOCITOS INTRAEPITELIALES  
EN LA  
ENFERMEDAD CELIACA**

Autor:

Edgardo Carlos Kolkowski  
Hospital Universitari Germans Trias i Pujol  
Unitat d' Immunologia.  
Carretera del Canyet s/n  
08916, Badalona  
Barcelona. España

Director:

Dolores Jaraquemada,  
Instituto de Biotecnología y Biomedicina  
Unidad d' Immunología Cellular  
Universitat Autònoma de Barcelona  
08193 Bellaterra, Cerdanyola del Valles  
Barcelona , España

Dolores Jaraquemada Pérez de Guzmán, Catedrática de Inmunología por la Universidad Autónoma de Barcelona,

Certifica: que la Tesis Doctoral Titulada: Linfocitos Intraepiteliales en la Enfermedad Celíaca, de la que es autor Edgardo Carlos Kolkowski, ha sido realizada bajo su dirección y considera que es apta para ser presentada y optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Y para que conste firma el presente certificado en Bellaterra el 7 de septiembre del 2004

Dra. Dolores Jaraquemada Pérez de Guzmán

***A mis padres***

“It will be interesting to learn more about epithelial lymphocytes, the heterogeneity of their receptors, their functions and their ligands. From this, we may be able to deduce their overall biological role”.

*Charles Janeway. 1988. Frontiers of the immune system. Nature. Volumen 333. página 804.*





<b>Índice</b>	<i>i</i>
<b>Abreviaturas</b>	<i>ix</i>
<b>Introducción</b>	1
<b>1. Enfermedad Celíaca.</b>	3
1.1 <i>Antecedentes históricos</i>	3
1.2 <i>Manifestaciones clínicas y enfermedades asociadas</i>	4
1.3 <i>Diagnóstico. Morfología de la Mucosa</i>	4
1.4 <i>Marcadores serológicos. Anticuerpos.</i>	7
1.5 <i>Factores genéticos: HLA-DQ2</i>	8
1.6 <i>Epidemiología</i>	9
1.7 <i>Resumen</i>	9
1.8 <i>Historia EC. Cronograma de las investigaciones mas importantes.</i>	10
<b>2. Sistema inmune de mucosa e inmunogénesis de la Enfermedad celíaca.</b>	13
2.1 <i>La mucosa intestinal</i>	13
2.2 <i>Estructura del GALT</i>	14
2.2.1 <i>Placas de Peyer</i>	14
2.2.2 <i>Ganglios Linfáticos Mesentéricos (MLN)</i>	15
2.2.3 <i>Linfocitos de Lámina Propia</i>	15
2.2.4 <i>Linfocitos Intraepiteliales (IELs)</i>	16
2.3 <i>Tránsito linfocitario en la mucosa</i>	16
2.4 <i>Síntesis de IgA</i>	18
2.5 <i>Autoinmunidad. Es la EC una enfermedad autoinmune?</i>	19
2.6 <i>Tolerancia oral. Mecanismos: Deleción clonal, anergia y supresión activa.</i>	19
2.7 <i>Enfermedades inflamatorias de la mucosa (IBD)</i>	24
2.8 <i>Citoquinas y Enfermedad Celíaca</i>	25
2.9 <i>Mecanismos inmunológicos de la Enfermedad Celíaca</i>	27
2.9.1 <i>Inmunidad innata e IL-15. Modelo de inducción de la enfermedad</i>	28
2.9.2 <i>Reactividad frente a Gliadina.</i>	28
2.9.3 <i>La Transglutaminasa en la enfermedad. Modelo de neoepítipo TG-gliadina.</i>	28
2.9.4 <i>Secuencia inmunogénica de la <math>\alpha</math>-Gliadina.</i>	30
2.9.5 <i>Péptido de 33 aa capaz de inducir la enfermedad.</i>	30
2.9.6 <i>Modelo animal de la Enfermedad celíaca</i>	31
2.10 <i>Resumen</i>	32
<b>3. Linfocitos Intraepiteliales</b>	35
3.1 <i>Antecedentes</i>	35
3.2 <i>Características Fenotípicas. Receptores y otras moléculas</i>	36
3.2.1 <i>Tiempo de inmunohistoquímica: Antisueros, Ac´s monoclonales y fluorocromos</i>	36
3.2.2 <i>Dos subpoblaciones principales de IELs. Linfocitos T <math>\alpha\beta</math> y <math>\gamma\delta</math></i>	37
3.2.3 <i>Correceptores</i>	37
3.2.4 <i>Moléculas de adhesión y circulación en el epitelio</i>	38

3.2.5 Moléculas co-estimuladoras	42
3.2.6 Moléculas de activación	42
3.2.7 Receptores NK	42
3.2.8 Otras moléculas	44
3.2.9 Receptores de quimiocinas	44
3.3 Producción de citoquinas por IELs	46
3.4 Cuál es la función de los IELs?	48
3.4.1 Oligoclonalidad del repertorio del TCR	48
3.4.2 Especificidad antigénica. IELs TCR $\alpha\beta$ .	49
3.4.3 Variabilidad y especificidad de los IELs TCR $\gamma\delta$	50
3.5 IELs en ratón. Origen, subtipos y función	51
3.5.1 Origen de los IELs.	51
3.5.2 Diferencias funcionales entre Tipo a y Tipo b.	52
3.5.3 Oligoclonalidad de los IELs en ratón. Seis datos concluyentes.	54
3.6 IELs y enfermedad celíaca	54
3.7 Resumen	55
3.8 Historia IELs en Humanos	56
<b>Objetivos</b>	59
<b>Métodos</b>	63
A-Técnicas de Biología Celular.	65
1. Obtención de Biopsias.	65
2. Generación y cultivo de líneas y clones T.	65
2.1 Protocolo Básico: Clonado de Linfocitos T.	65
2.1.1 Protocolo asociado: Procesamiento de suero.	66
2.1.2 Protocolo asociado: Test de sueros.	66
2.1.3 Protocolo asociado: Titulación de IL-2 utilizando la línea CTLL-2.	66
2.1.4 Protocolo asociado: Aislamiento de PBMC por Gradiente de Ficoll-Isopaque.	67
2.1.5 Protocolo asociado: Irradiación de células.	67
2.1.6 Protocolo asociado: Congelación de células.	67
3. Cultivo de Líneas celulares	68
3.1 Protocolo Básico : Cultivo de líneas celulares	68
3.1.1 Protocolo asociado: Cultivo de la línea CTLL-2	68
3.1.2 Protocolo asociado: Tratamiento para Micoplasma.	69
3.1.3 Protocolo asociado: Transformación con el Virus de Epstein Bar	69
3.1.4 Protocolo asociado: Estimulación con IFN- $\gamma$	69
4. Inmumarcaciones. Citometría de flujo.	69
4.1 Protocolo Básico: Tinción de superficie con AcMo's	69
4.1.1 Protocolo asociado: Inmunomarcación en placa de 96 fondo V	71

5. Estudios Funcionales	71
5.1 Protocolo Básico: Determinación de la actividad citotóxica de las células T.	71
5.1.1 Protocolo alternativo: Inhibición de la citotoxicidad.	71
5.1.2 Protocolo alternativo: Inhibición de la lisis por células frías.	72
5.1.3 Protocolo alternativo: inhibición de la exocitosis de los gránulos de perforina e inhibición de la vía de las caspasas.	72
5.1.4 Protocolo alternativo: Lisis redirigida sobre la línea P815.	72
5.2 Protocolo Básico: Proliferación de linfocitos T.	72
5.3 Protocolo Básico: Determinación de Citoquinas por Citometría (CBA)	72
5.3.1 Protocolo alternativo: ELISA (Enzyme Linked-Immuno- Sorbent Assay ).	73
5.3.2 Protocolo asociado: Estimulación de células T para la producción de citoquinas.	73
5.4 Protocolo Básico: Citoadherencia de Linfocitos T sobre secciones de epitelio intestinal.	73
5.4.1 Protocolo asociado: Tinción Hematoxilina- Eosina.	74
B-Técnicas de Biología Molecular.	75
6. Estudios moleculares	75
6.1 Protocolo Básico: Análisis del TCR $\gamma\delta$ por RT-PCR.	75
6.1.1 Protocolo Alternativo: Secuenciación del TCR $\delta$ (TRDV1).	77
6.2 Protocolo Básico: Análisis del TCR $\alpha\beta$ por RT-PCR.	77
6.2.1 Protocolo Alternativo: Secuenciación del TCR $\alpha 2$ (TRVA12).	78
6.2.2 Protocolo Alternativo: Análisis de longitud del CDR3 (Spectratyping).	78
6.2.3 Protocolo asociado: Aislamiento de RNA	78
6.2.4 Protocolo asociado: Retrotranscripción.	79
6.2.5 Protocolo asociado: Diseño de cebadores	82
6.2.6 Protocolo asociado: Cuantificación de cebadores.	82
6.2.7 Protocolo asociado: Cálculo de la $T_m$	82
6.3 Protocolo Básico: Análisis de los receptores NK.	83
6.4 Protocolo Básico: Amplificación de citoquinas por PCR en Tiempo Real.	83
6.4.1 Protocolo alternativo: Amplificación de citoquinas por RT-PCR.	83
6.4.2 Protocolo asociado: Estimulación con PMA/Ionomicina.	85
6.5 Protocolo Básico: Hibridación de mRNA para CD1 d.	85
6.5.1 Protocolo asociado: Transformación bacteriana con pSR1aNEO-CD1d.	85
6.5.2 Protocolo asociado: Purificación de plásmido (Megaprep).	85
6.5.3 Protocolo asociado: Aislamiento del Inserto	86
6.5.4 Protocolo asociado: Marcaje de un fragmento largo de DNA	86
6.6 Protocolo Básico: Hibridación de DNA por DOT Blot con una sonda CDR3- $V\alpha 2$	86
6.6.1 Protocolo asociado: Hibridación con sonda	86
6.6.2 Protocolo asociado: Marcaje sonda	87
6.7 Soluciones	88

<b>Resultados</b>	89
<b>Prólogo</b>	91
<b>Capítulo I. NEC44.25: IEL con reactividad epitelial</b>	95
1.1 Aislamiento de un clon con fenotipo IEL de una biopsia no celíaca	97
1.2 Otros marcadores celulares del clon NEC44.25	97
1.3 Análisis del TCR	98
1.4 Reactividad sobre distintos tipos celulares.	100
1.5 Reconocimiento de células epiteliales	101
1.5.1 Mecanismo de lisis de células epiteliales	102
1.6 El TCR está involucrado en el reconocimiento de células epiteliales pero no en la actividad NK	103
1.6.1 Inhibición de la citotoxicidad por AcMo $\alpha$ -TCR $\alpha\beta$	103
1.6.2 CD103 y el reconocimiento de epitelio	104
1.6.3 Receptores NK involucrados en el reconocimiento de líneas epiteliales	105
1.7 En busca del ligando epitelial. Las moléculas de HLA clase I y clase II no están involucradas en el reconocimiento de células epiteliales	106
1.7.1 CD1	108
1.7.2 Reconocimiento de MICA vía NKG2D. El TCR no participa de este reconocimiento	110
1.8 Producción de citoquinas.	112
1.8.1 Determinación de citoquinas por PCR en Tiempo Real	113
1.8.2 Detección de citoquinas por CBA	113
1.9 Citoadherencia sobre secciones de tejido	115
Capítulo I: Discusión	117
<b>Capítulo II. IELs TCR <math>\alpha\beta</math> +CD8<sup>+</sup></b>	125
2.1 IELs expandidos a partir de mucosa celíaca y no celíaca. Análisis de clones TCR $\alpha\beta$ , CD8 <sup>+</sup> , CD103 <sup>+</sup>	125
2.1.1 Expresión de CD28 y CD94.	125
2.1.2 Receptores de quimiocinas: CXCR3, CXCR4 y CCR5.	128
2.2 Patrón de citoquinas. Diferencias entre IELs aislados de biopsias celíacas y no celíacas	129
2.2.1 Diferencias en la producción de IL-10 e IL-2	134
2.2.2 Síntesis de IL-4 e IL-5: no hay diferencia	135
2.3 Reactividad frente a líneas epiteliales. Tres patrones diferentes	137
2.3.1 Distribución del patrón citotóxico entre los clones NEC y EC	138
2.4 Citotoxicidad, receptores NK y citoquinas	141
Capítulo II: Discusión	143

<b>Capítulo III. Expansión de una población CD8<sup>+</sup> V<math>\alpha</math> 2.3 productora de IL-4</b>	151
3.1 Fenotipo de los clones obtenidos de la expansión de células CD8 <sup>+</sup> de una biopsia 0 celíaca (EC21)	153
3.2 Análisis del TCR	153
3.3 Determinación de la clonalidad del receptor	157
3.3.1 Análisis de la longitud del CDR3 de los amplímeros de V $\alpha$ 2 y V $\beta$ 8	157
3.3.2 Secuenciación de la cadena $\alpha$ del TCR	159
3.3.3 Secuenciación de la cadena $\beta$ del TCR	159
3.4 Expresión de V $\alpha$ 2 en otras biopsias	164
3.4.1 Clonalidad del V $\alpha$ 2 expresado en otras biopsias.	164
3.4.2 Está presente el CDR3 dominante en EC21 en los clones V $\alpha$ 2 en otras biopsias?	166
3.4.3 Expresión de V $\alpha$ 2 en clones aislados de otras biopsias	167
3.5 Reactividad frente a células epiteliales.	168
3.5.1 Reconocimiento de las células Caco2	169
3.5.2 El TCR está involucrado en el reconocimiento CaCo2	169
3.5.3 Expresión de moléculas efectoras	169
3.5.4 Reconocimiento de MIC vía NKG2D	170
3.6 Citoquinas	171
3.6.1 Cuantificación de citoquinas por PCR a tiempo real	171
3.6.2 Cuantificación de citoquinas por CBA	172
3.6.3 Coestimulación a través de NKG2D	173
Capítulo III: Discusión	175
<b>Capítulo IV. IELs <math>\gamma\delta</math> en Enfermedad Celíaca</b>	179
4.1 Linfocitos T $\gamma\delta$ en biopsias celíacas.	181
4.2 Clonación de las biopsias EC9 y NEC40	181
4.3 Heterogeneidad del repertorio TCR $\gamma\delta$ en los clones T aislados de la mucosa intestinal	185
4.3.1 Repertorio V $\gamma$ y V $\delta$	185
4.3.2 Análisis del CDR3 en los clones V $\delta$ 1	185
4.4 Producción de citoquinas y expresión de receptores de quimiocinas	186
4.4.1 Determinación y cuantificación de Citoquinas por Citometría de flujo	187
4.5 Reconocimiento de líneas epiteliales por linfocitos T $\gamma\delta$ de mucosa intestinal	189
4.6 El reconocimiento de células epiteliales por las células $\gamma\delta$ está mediado por el TCR	192
4.7 Ningún elemento de restricción conocido está asociado al reconocimiento de las células epiteliales por los linfocitos T $\gamma\delta$ .	193
4.7.1 Los ligandos del TCR para los clones T V $\delta$ 1 y V $\delta$ 3 son distintos a HLA clase-I, CD1 o MIC	193
4.8 Coestimulación en las células $\gamma\delta$	196
Capítulo IV: Discusión	199

<b><i>Discusión General</i></b>	205
<b><i>Conclusiones</i></b>	215
<b><i>Bibliografía</i></b>	219
<b><i>Anexo</i></b>	237
<b><i>Agradecimientos</i></b>	241





EC, Enfermedad Celíaca  
RCS, Enfermedad Celíaca Refractaria  
IELs, Linfocitos Intraepiteliales  
LPL, Linfocito de Lámina Propia  
LP, Lámina Propia  
CE, Células Epiteliales  
TCR, Receptor de Células T  
CDR3, Región Determinante de Complementariedad  
PHA, Phaseolus vulgaris agglutinin  
PHA-L, Leucoaglutinina  
SFB, Suero Fetal Bovino  
GALT, Sistema Linfoide Asociado a Mucosa Intestinal  
MALT, Sistema Linfoide Asociado a Mucosa  
PP, Placas de Peyer  
MLN, Nódulos Linfáticos Mesentéricos  
IBD, Enfermedades Inflamatorias Intestinales  
CU, Colitis Ulcerosa  
DH, Dermatitis Herpetiforme  
HLA, Human Leucocyte Antigen  
AGA, anticuerpos-anti-gliadina  
ARA, anticuerpos anti Reticulina  
TG, Transglutaminasa  
AcMo, Anticuerpo Monoclonal  
IFI, Inmuno Fluorescencia Indirecta  
ITIM, Inmunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif  
ITAM, Inmunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif  
SH2, Src Homology-containing Tyrosine phosphatase  
APC, Célula Presentadora de Antígeno  
Tg, Transgénicos  
KO, knockout  
TL, Thymus Leukemia antígeno  
COX-2, Ciclooxygenasa-2

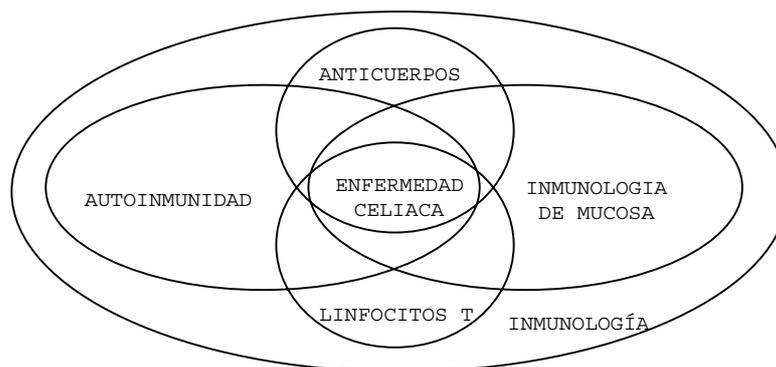




El presente trabajo tiene como objetivo la caracterización funcional de distintas poblaciones de linfocitos T de la mucosa del intestino delgado para poder hipotetizar sobre su implicación en el desarrollo de la Enfermedad Celíaca (EC).

## 1. Enfermedad celíaca

La Enfermedad Celíaca (EC) es un proceso inflamatorio con un componente autoinmune que afecta a la mucosa del intestino delgado (**figura 1.1**). Se induce en pacientes genéticamente susceptibles tras la ingestión de alimentos que contienen gluten. Durante el desarrollo de la EC se produce un incremento de linfocitos T en el epitelio y en la lámina propia (LP) que concluye con la atrofia de las vellosidades intestinales y la hiperplasia de las criptas. La única terapia efectiva es la eliminación de la dieta de cereales como el trigo, la cebada y el centeno que contienen las proteínas inductoras de la enfermedad. La incidencia de la enfermedad es aproximadamente de 1:250 y en caso de que no se trate se incrementa el riesgo de aparición de linfomas y de mortalidad.



**Figura 1.1:** El estudio de la fisiopatología de la EC supone interrelacionar distintos aspectos de la inmunología: el sistema inmune de mucosa, la autoinmunidad, la respuesta inmune celular (linfocitos T) y la humoral (linfocitos B).

### 1.1 Antecedentes Históricos

La EC fue descrita en el año 1888 por el médico cirujano Samuel Gee (1839-1911) en el Hospital St Bartholomew's, de Londres. En su trabajo titulado "*On the coeliac<sup>1</sup> affection*" hace una descripción clínica de la enfermedad: presencia elevada de grasas en las heces (esteatorrea) y distensión abdominal y como tratamiento recomienda la ingesta moderada de comidas a base de

<sup>1</sup>La palabra inglesa "Coeliac" hace referencia a la cavidad abdominal. Deriva del griego Koilia, que significa vientre. Otros nombres: Celiac sprue (CS), Coeliac disease, Gluten intolerance, Gee-Herter disease, Gluten Sensitive Enteropathy (GSE), Gluten Sensitivity, Ideopatic Steatorrhea, Intestinal infantilism, Malabsortion syndrome, Nontropical sprue (NTS), The Celiac Affection, The Celiac Condition, The Celiac Syndrome.

harinas. En el año 1908, el pediatra Herter (“Gee-Herter disease”), observa que las grasas son mejor toleradas que los carbohidratos. En la década de los 50, el pediatra alemán W. K. Dicke de la Universidad de Utrecht, en su tesis doctoral, sugiere la presencia de un “**factor**” en el trigo, el centeno y la cebada, que favorece el desarrollo de la enfermedad. Más tarde Charlotte Anderson encuentra, tras la separación de hidratos de carbono y otros compuestos de la harina del trigo, que el *factor* implicado en el desarrollo de la enfermedad estaba en la “masa cohesiva” resultante (“**gluten<sup>2</sup> mass**”) (1). El mismo año J.W. Paulley describe, tras la operación de un paciente celíaco adulto, la presencia de una anomalía en la capa que recubre la superficie interna del intestino delgado. Además de la presencia de inflamación, describe la pérdida de proyecciones microscópicas (vellosidades), responsables de conferir al intestino una mayor superficie de absorción (2). A partir del año 1953, con la aparición de las primeras técnicas de endoscopia, se comenzaron a analizar biopsias intestinales. En el año 1957, Crosby and Kugler fabricaron una cápsula con un tubo flexible que facilitaba la toma de muestras (cápsula de Crosby-Kugler). En el año 1960 M. Shiner e I. Doniach interpretan los cambios producidos en el intestino de los enfermos celíacos mediante el uso de biopsias perorales (3,4). Años más tarde, en 1972, Anne Ferguson describe el aumento de linfocitos intraepiteliales en el yeyuno de 20 pacientes celíacos adultos.

Desde 1980 se han ido desarrollando trabajos que han permitido comprender ciertos aspectos de la inmunopatología de la enfermedad. Estos avances se irán mencionando a lo largo de la introducción. Al final de esta primera parte se resumen los principales trabajos realizados sobre la EC.

## **1.2 Manifestaciones clínicas y enfermedades asociadas**

La enfermedad se manifiesta principalmente en niños de entre 4 y 24 meses de edad cuando pasan de la lactancia materna a la dieta con gluten. Los síntomas clínicos más comunes son las diarreas y la distensión abdominal. Estos pueden acompañarse de vómitos y retraso en el crecimiento. Hoy en día son menos comunes la esteatorrea y el dolor abdominal. La enfermedad

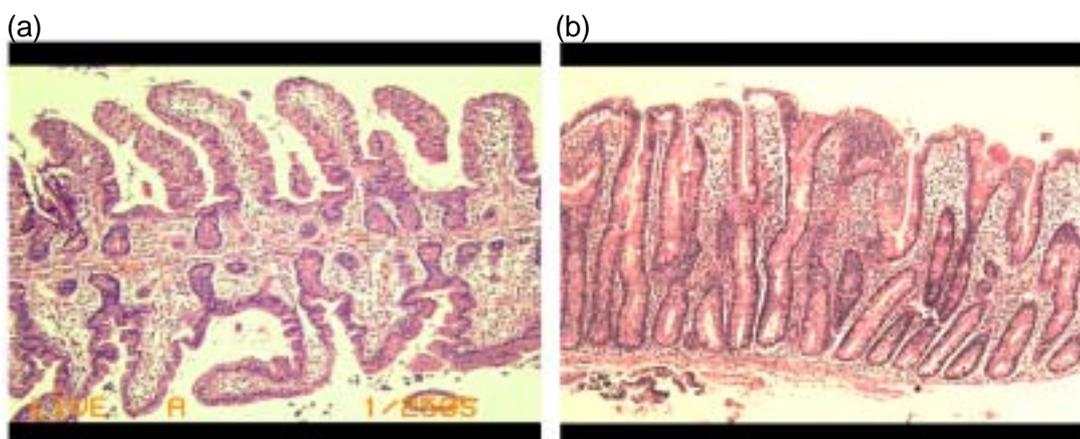
<sup>2</sup>Gluten: Parte cohesiva (adherente, aglutinante), no soluble, que resulta del lavado de la masa. Forma parte de las Proteínas de almacenamiento que están en cereales como el trigo (wheat), Cebada (barley), avena (oats), arroz (rice) y centeno (rye). Estas se clasifican según su solubilidad (Osborne-1907) en: Albúminas (solubles en agua o solución salina diluida y coagulan con el calor), Globulina (insolubles en agua, pero soluble a baja concentración salina), Prolaminas (solubles en alcohol), Glutelinas (solubles en ácidos o bases diluidos, detergentes, disociantes como la urea o agentes reductores como el Beta – Mercaptoetanol) . Según estructura y composición se clasifican (Shewry, 1986) en: Albúminas y Globulinas: Nutricionalmente balanceado. Rico en lisina, triptofano y metionina, Glutelinas : poliméricas de alto peso molecular (600-800 residuos ) o bajo peso molecular (270/330), Los polímeros se establecen por puentes disulfuro itercatenarios. En el trigo reciben el nombre de Gluteninas Prolaminas (distinto nombre según la especie de gramínea: Gliadinas-Trigo-, Aveninas-Avena-, Zeinas-maíz-, secalinas -arroz-, hordeinas - cebada) Las gliadinas: Son monómeros de entre 250-300 residuos de aa. Se clasifican según su composición en alfa, gamma y omega gliadinas. Tanto las glutelinas como las Prolaminas son ricas en prolina, Glutamina (Gln), Arginina y Asparragina. Dentro de cada clase difieren poco en secuencia. Existen dentro de una misma variedad de semilla por lo menos unas 45 gliadinas diferentes a nivel proteico (5).

puede ir acompañada también de anemias por deficiencia en ácido fólico, osteoporosis, deficiencia de vitamina K, hipertransaminasemia, entre otras características menos comunes, mientras que los adultos presentan principalmente diarreas y anemias por deficiencias en hierro (6).

La Dermatitis Herpetiforme (DH) se considera una manifestación clínica de la celiaquía. Es una enfermedad de la piel que se caracteriza por la presencia de rash cutáneo cuyo diagnóstico se confirma por la existencia de depósitos de IgA's en las zonas de piel con apariencia normal. El 75% de los enfermos presenta además atrofia de las vellosidades e hiperplasia de las criptas y en el resto pueden encontrarse cambios menores en la mucosa (7). Los pacientes con DH también responden a una dieta libre de gluten y comparten factores genéticos de susceptibilidad con la EC. La manifestación clínica de la DH en EC se presenta mayoritariamente en adultos. Existen otras enfermedades autoinmunes asociadas a la EC, como la Diabetes Tipo 1 (3% y 8 % de los enfermos tienen diabetes de Tipo 1 (6), la tiroiditis autoinmune, el síndrome de Sjögren y la artritis reumatoide.

### 1.3 Diagnóstico. Morfología de la mucosa

Las características estructurales típicas de la mucosa en pacientes celíacos con una dieta rica en gluten son la *atrofia o ausencia de las vellosidades y la hiperplasia de las criptas*. Histológicamente se observa un aumento de linfocitos<sup>3</sup> en el epitelio y de linfocitos y células plasmáticas en la Lámina Propia (LP), además de neutrófilos, mastocitos, basófilos y eosinófilos (**figura 1.2**). La histología de la mucosa intestinal sirve para confirmar el diagnóstico clínico de la EC. Las biopsias se obtienen a nivel de la parte distal del duodeno, a la altura del ángulo de Trietz, utilizando una cápsula de Crosby-Kugler (de uno o dos orificios).



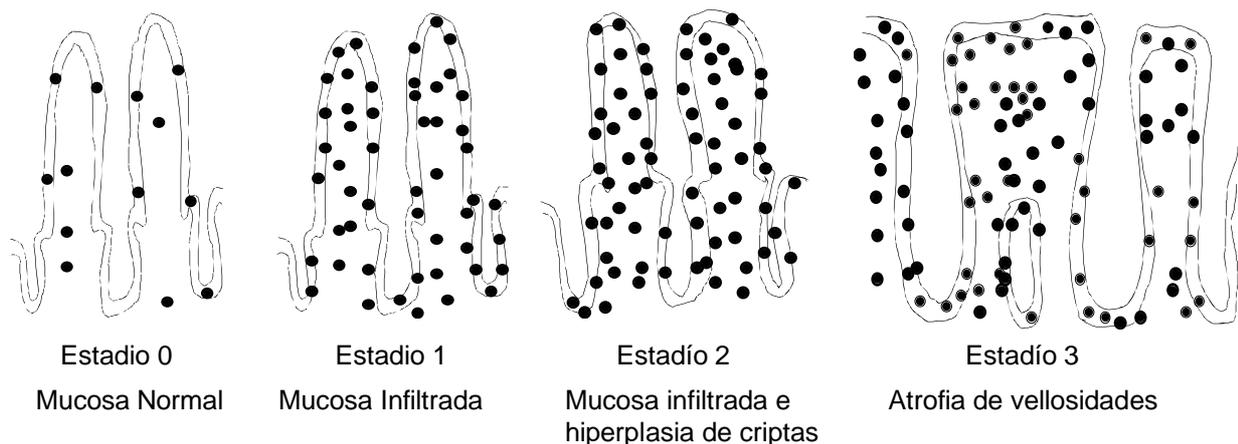
**Figura 1.2:** Histología de la mucosa del intestino delgado. (a) En la histología normal del duodeno se visualizan claramente las vellosidades y las criptas. (b) En la mucosa intestinal de enfermos Celíacos se observa la desaparición de las vellosidades (mucosa plana) y la hiperplasia de las criptas, además de un importante infiltrado leucocitario en la lámina propia y en el epitelio.

Los criterios actuales para confirmar la enfermedad se establecieron en Budapest en el año 1989 por la ESPGAN (*European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition*) (8) y establecen lo siguiente:

- 1) *Biopsia intestinal en la que se observe: mucosa plana, atrofia de vellosidades, hiperplasia de criptas mientras el paciente mantiene una dieta con gluten.*
- 2) *Remisión completa de los síntomas al retirar el gluten de la dieta. Esta respuesta es esperable a las pocas semanas.*

De esta forma se suprime la necesidad de realizar tres biopsias como se había establecido 20 años antes<sup>4</sup>. De un estudio hecho sobre 652 casos, el 95 % de los ellos se confirmaron con la primera biopsia (8).

El daño en la mucosa celíaca pasa por tres estadios clasificados arbitrariamente como: 1) *infiltrativo*, en el que se aprecia un aumento de los **linfocitos Intraepiteliales (IELs)**, con una morfología normal de vellosidades y cripta, 2) *hiperplásico*, además del infiltrado linfocitario en el epitelio, se observa un agrandamiento de las criptas y 3) *destrutivo*, característico de la mucosa plana, en el que además aparece la atrofia de la vellosidad ("Flat") (9). Estos estadios están dinámicamente relacionados (**Figura 1.3**).



**Figura 1.3:** Estadios de la EC.

Algunos individuos con una morfología normal de la mucosa pueden tener una *EC latente* y desarrollar la enfermedad luego de cierto tiempo. Se puede sospechar de una EC latente cuando existe un mayor número de IELs  $\gamma\delta$  o incremento en el título de anticuerpos característicos de la EC. Estos pacientes son también genéticamente susceptibles a la EC. Cuando un enfermo celíaco no presenta síntomas, puede tener una *EC silente*, pero a diferencia de la EC latente, estos individuos tienen la mucosa del yeyuno dañada (10). Estos pacientes son detectados tras el

<sup>3</sup>Ferguson y Murray describieron en 1971 que la enfermedad se asocia con un infiltrado inflamatorio en la pared de la mucosa del intestino delgado (Ferguson A, Murray D. *Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human jejunal. Gut* 1971; 12:99:88-92)

estudio de grupos de riesgo, como son los que poseen familiares de celíacos, en pacientes con déficit de IgA o en pacientes con otras enfermedades autoinmunes. Ciertos pacientes que no responden a la dieta libre de gluten presentan una *celiaquía refractaria*. Estos enfermos pueden tener linfomas asociados a la aparición de IELs que no expresan el TCR en superficie (CD3<sup>-</sup>, CD7<sup>+</sup>)

#### **1.4 Marcadores serológicos. Anticuerpos**

Otra característica de la enfermedad es la aparición de diferentes tipos de anticuerpos. La presencia de los mismos en el suero de los pacientes en el momento del diagnóstico y su desaparición durante la retirada del gluten de la dieta son elementos que complementan y sustentan el resultado del análisis de la biopsia. En casos en el que el diagnóstico de la EC no sea claro, se debe confirmar con sucesivas biopsias. Estos anticuerpos son específicos de gliadina, reticulina, endomisio o transglutaminasa (Tg).

##### *Anticuerpos anti-gliadina (AGA).*

Las gliadinas son proteínas (prolaminas) presentes en el gluten<sup>2</sup>. En el año 1958 se describe por primera vez la presencia de anticuerpos aglutinantes de gluten en suero de pacientes celíacos (11). La determinación de AGA se valida en el año 1981 y actualmente se realiza mediante ELISA. Si bien estos anticuerpos (de isotipo IgA o IgG) son moderadamente sensibles, no son específicos de la enfermedad, ya que están presentes en otras patologías e incluso se pueden detectar a bajos niveles en sueros normales. La presencia de anticuerpos anti-endomisio y transglutaminasa es más específica y más usada como técnica de diagnóstico. En la actualidad se utiliza para monitorizar transgresiones de dietas libres de gluten y en pacientes menores de 2 años sigue siendo utilizado como marcador serológico (IgA) (12).

##### *Anticuerpos anti-reticulina (ARA):*

Según el patrón de reconocimiento de tejido conectivo sobre secciones de tejido congelado de riñón e hígado de rata, los ARA están clasificados en 5 subtipos (R1, R2, Rs, R3 y R4). El patrón de reconocimiento de las fibras del tejido conectivo peritubular y periglomerular de los anticuerpos IgA R1-ARA es el específico de la EC y de la DH. Estos tienen una elevada especificidad (cerca del 100%), pero la complicada interpretación de los patrones y su baja sensibilidad hacen que hoy en día no se la utilice como test de laboratorio para el seguimiento de la enfermedad.

<sup>4</sup> "Tempere meeting: Año 1969". En la Ciudad Finlandesa de Tempere tuvo lugar la primera reunión donde se enunciaron los criterios para el diagnóstico de la enfermedad. En esta se establece la necesidad de tres biopsias. En la primera se debe observar una estructura anormal de la mucosa durante una dieta rica en gluten, en la segunda debe aparecer una mejora en la estructura de la vellosidad cuando se deja de ingerir gluten, y en la tercera, tras un desafío con gluten reaparece un deterioro en la morfología de la mucosa.

*Anticuerpos anti-endomiso (EMA):*

La presencia en enfermos celíacos de anticuerpos IgA anti-endomiso (capa que recubre un grupo de células musculares lisas) se observa por primera vez en 1983 (13). La determinación se hace por IFI (Inmuno Fluorescencia Indirecta) sobre cortes de esófago de mono o de cordón umbilical humano. La sensibilidad (85%-98%) y la especificidad (97-100%) es superior a la de AGA.

*Anticuerpos anti-Transglutaminasa (Ac anti-TG):*

En 1997 Dietrich y col. encuentran que el autoantígeno reconocido por anticuerpos anti-endomiso era la Transglutaminasa (TG) (ver apartado 2.9, pg.29) (14). Los niveles de Ac anti-TG pueden ser muy bajos o indetectables en caso de que la atrofia sea muy leve. Si bien es difícil obtener falsos negativos, estos pueden darse en pacientes con menos de 2 años o con déficit de IgA. Pacientes con una deficiencia en IGA's tienen un riesgo 10 veces superior de tener la enfermedad (7).

La determinación de Ac's no puede tomarse como valor diagnóstico por la presencia de falsos positivos y negativos. Además, ocasionalmente pueden aparecer casos de celiaquía en pacientes con hipogammaglobulinemia y/o asociados a una deficiencia de IgA's. En estos casos se deben determinar Ac's de isotipo IgG's (15). Estos anticuerpos desaparecen cuando se suspende la ingesta de gluten.

**1.5 Factores genéticos: HLA-DQ2<sup>5</sup>**

La EC está fuertemente asociada con la expresión del alelo HLA-DQ2 y en menor medida con DQ8 (16). Un estudio realizado en 94 niños celíacos no relacionados indicó que el 98% compartían una combinación particular de los alelos DQA1\*05/DQB1\*02 que codifican para la molécula HLA-DQ2. Están ubicados en *cis* dentro del haplotipo DR3-DQ2 (DRB1\*0301-DQA1\*0501/DQB1\*0201) y en *trans* en el genotipo heterocigoto DR5-DQ7 y DR7-DQ2. Este último contiene el alelo DQA1\*0505 en un cromosoma (DRB1\*11/12-DQA1\*0505/DQB1\*0301) y DQB1\*0202 en el cromosoma homólogo (DRB1\*07-DQA1\*0201/DQB1\*0202) (17).

<sup>5</sup>El sistema mayor de Histocompatibilidad (HLA), está formado por un conjunto de genes polimórficos que codifican proteínas responsables de la presentación de antígenos a células T. Sobre la década del 50, George Snell a partir de la generación de cepas congénitas y el rechazo de tumores, y Dausset, con el descubrimiento de antiseros en pacientes transfundidos, determinaron la existencia de este complejo. En 1980, año en el que reciben el premio nobel, no se sabía cuál era su función. El rechazo de injerto no era la única razón. En 1996, Peter Doherty y Rolf Zinkernagel recibieron el premio Nobel por sus trabajos, iniciados en la década de los 70, que demuestran que los linfocitos T citotóxicos reconocían péptidos virales presentados en contexto de MHC propios.

La frecuencia de DQA1\*05/DQB1\*02 en población normal es del 25%. Los pocos pacientes negativos para este haplotipo son HLA-DR4-DQ8, es decir DR-1\*04-DQA1\*0301/DQB1\*0302. El DR5/7 es menos frecuente que DR3. En Noruega la población DR5/7 es cercana al 1%, en Italia del 30% y la media mundial es del 8%.

El análisis de los motivos de anclaje de péptidos a DQ2 indica que este tiene preferencia por residuos negativos en las posiciones P4, P6 o P7 y DQ8 en las posiciones P1, P4 o P9. Estos sitios son de vital importancia para la presentación de residuos de ácido glutámico (Glu) presente en los fragmentos de gliadina deaminada por la transglutaminasa (ver apartado 2.9, página 27). Es importante aclarar que las células epiteliales del intestino delgado expresan HLA-DR y DP, pero no HLA-DQ, razón por la que la dichas células no son reponsables de la presentación de péptidos asociados a DQ2 (18-23).

### **1.6 Epidemiología**

La EC tiene una incidencia que varía entre el 1/100 y el 1/1000 según la región geográfica. Por ejemplo, en Estados Unidos la prevalencia es de 1/400 sobre el análisis en sangre de anticuerpos anti Endomisio (EMA), realizados sobre una población adulta de 2000 donantes voluntarios (24). Este índice es de 1/700 en Brasil (25), de 1/130 en Finlandia, de 1/190 en Suecia (26), de 1/400 en la zona norte de España (27) y en Buenos Aires 6 de cada 1000 individuos (1/170) tienen la enfermedad (28).

### **1.7 Resumen**

La EC es una patología crónica que afecta la mucosa del intestino delgado. Se desarrolla en pacientes genéticamente susceptibles tras la ingestión de gluten y sólo una dieta libre de estas proteínas produce la regresión del proceso inflamatorio. Afecta aproximadamente a 1 de cada 250 individuos. Se han enumerado las principales características de la enfermedad y algunos de los elementos vinculados a la patología como son el gluten (*gliadina*) como factor desencadenante de la enfermedad, la presencia de *anticuerpos*, *el aumento de IELs*, y un factor de riesgo como es la presencia de un haplotipo *HLA* determinado (DQ2). Todos estos factores están actuando sobre un sistema complejo: *el sistema inmune de mucosa*.

## 1.8 Historia EC. Cronograma de las investigaciones más importantes

- **1888** Descripción de la Enfermedad - Dr Samuel Gee St Bartholomew's Hospital, London . On the celiac affection. Gee, SSt Barth Hosp Rep 1888;24:17-20.
- **1953** Factor (gliadina) del trigo desencadenante de la enfermedad.  
*Coeliac disease. Part II: The presence in wheat of a factor having a deleterious effect in cases of coeliac disease. Dicke WK, Weijers HA, van de Kamer JH. Acta Paediatr. 1953; 42:34-42.*  
If (in cases of celiac disease) wheat is banished from the diet and rice flour, maize starch, peeled, boiled potatoes are given instead, the anorexia, vomiting, and abdominal pain disappear, the acute attacks of diarrhoea cease, the faeces become darker in colour, the patient gains in weight, and finally the growth in height becomes normal, or even more than normal.
- **1954** Observación de la lesión en la mucosa.  
*Observations on the aetiology of idiopathic steatorrhea. Paulley LW (BMJ) (2).*
- **1957** Colonel Crosby and Kugler fabrican la cápsula para realizar biopsias.
- **1958** Anticuerpos aglutinantes de gluten en suero de pacientes celíacos.  
*Allergic pathogenesis of celiac disease with studies of the splitting up of pathogenic antigens by enzymes Berger (11).*
- **1960** Interpretación de los cambios producidos en la superficie intestinal de los pacientes celíacos.  
*Histopathologic studies in steatorrhea. Shiner M, Doniach I (Gut) (3).*  
*Coeliac disease: histopathological findings in the small intestinal mucosa studies by a peroral biopsy technique (4).*
- **1971** Cuantificación de IELs en el yeyuno humano. Aumento en enfermos celíacos.  
*Quantification of intraepithelial lymphocytes in human jejunum. Ferguson A (Gut) (29).*
- **1972** Infiltrado de linfocitos en el diagnóstico de enteropatías por sensibilidad a gluten. Fry L. (Br Med J.) (30)
- **1983** Descripción de subpoblaciones en epitelio intestinal  
*Lymphocyte subpopulations in the human small intestine. The findings in normal mucosa and in the mucosa of patients with adult coeliac disease Selvy (Clin Exp. Immunol) (31).*  
*Immunohistologic and immunoelectron microscopic characterization of the mucosal lymphocytes of human small intestine by the use of monoclonal antibodies. (J.Immunol) (32).*
- **1987** Descripción de un marcador celular característico de IEL's.  
*A monoclonal antibody (HML-1) defining a novel membrane molecule present on human intestinal lymphocytes Cerf-Bensussan (Eur J Immunol) (33).*
- **1988** Descripción de las etapas de la lesión  
*Studies of intestinal lymphoid tissue. X-observations on granular epithelial lymphocytes (gEL) in normal and diseased human jejunum. Marsh, M. N. (34).*
- **1989** Asociación genética de la enfermedad con HLA-DQ.  
*Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. Sollid (JEM) (16).*

- **1989** Expresión de  $\gamma\delta$  en epitelio intestinal humano.  
*Expression of disulfide-linked and non-disulfide-linked forms of the T cell receptor gamma/delta heterodimer in human intestinal intraepithelial lymphocytes. Spencer. (Eur J Immunol)(35).*
- **1989** Incremento de  $\gamma\delta$  en celíacos.  
*Intraepithelial T cells of the TcR gamma/delta+ CD8- and V delta 1/J delta 1+ phenotypes are increased in coeliac disease. Halstensen. (Scan. J. Immunol) (36).*
- **1990** Revisión de criterios para el diagnóstico de la Enfermedad.  
Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Walker-Smith (8)
- **1993** Reconocimiento de la gliadina por células T  
*Gliadin-specific, HLA-DQ (alpha1\*0501, beta 1\*0201) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. Lundin, K.E(JEM) (37)*
- **1997** Identificación de la Transglutaminasa como autoantígeno.  
*Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. Dietrich, W. (Nat Med) (14)*
- **1998** Primer epitopo de  $\gamma$ -gliadina asociada a DQ2 reconocido por células T de mucosa .  
*Identification of a gliadin T-cell epitope in coeliac disease: general importance of gliadin deamidation for intestinal T-cell recognition. Sjomstron. (Scand J Immunol) (38)*
- **1998** Asociación entre la Transglutaminasa y la Gliadina.  
*Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. Molberg, O (Nat Medicine) (39)*
- **1999.** Modelo animal con patología similar a la enfermedad celíaca. Bloqueo de la producción de PGE2 La expresión normal de PGE2 por células estromales induciría la diferenciación de DCs productoras de IL-10, generando una disminución de la respuesta inmune local.  
*Cyclooxygenase-2-dependent arachidonic acid metabolites are essential modulators of the intestinal immune response to dietary antigen. Newberry, R. (Nat Medicine) (40).*
- **2000** Secuencia inmunogénica de la  $\alpha$ -gliadina  
*The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase Arentz . (JEM) (41).*  
*In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. Anderson. (Nat Medicine) (42)*
- **2000** Efecto de la IL-15 en la mucosa celíaca  
*Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. Maiuri (43)*
- **2002** Péptido de 33 aa resistente a proteasas responsable de inducir la enfermedad  
*Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. Shan, L. (Science) (44)*
- **2002** Explicación de porque ciertas prolaminas (gliadina) son tóxicas y otras no (aveninas)  
*Specificity of tissue transglutaminase explains cereal toxicity in celiac disease. Vader. J (JEM) (45).*
- **2003** Activación del sistema inmune innato por un péptido no inmunodominante en un sistema de cultivo in vitro de biopsias e inducción de la EC.  
*Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. Maiuri, L. (The Lancet) (46).*



## 2. Sistema inmune de mucosas e inmunogénesis de la Enfermedad Celíaca

Una de las principales funciones del sistema inmunitario es la de decidir frente a qué señales debe iniciar la respuesta inmune, es decir, diferenciar entre un agente “inconveniente o potencialmente dañino”, como un patógeno bacteriano o vírico, y un antígeno “inocuo” como son los antígenos propios o las proteínas presentes en los alimentos. Una decisión equivocada puede llevar a una respuesta inmune perjudicial para el organismo, como las reacciones de hipersensibilidad o las respuestas autoinmunitarias<sup>6</sup> En los últimos años se han realizado nuevos avances en este sentido con el descubrimiento de los PRR (Pattern Recognition Response) y de las señales de peligro, necesarios para iniciar la activación del sistema inmune (47).

La mucosa, en especial la intestinal y la de las vías respiratorias, están en contacto continuo con agentes extraños potencialmente inmunogénicos. Es por esto que el sistema inmune asociado a la mucosa debe impedir una respuesta innecesaria frente a antígenos inocuos a través de *mecanismos de regulación* y a la vez permitir la generación de respuestas inmunitarias normales frente a patógenos.

### 2.1 La mucosa intestinal

El intestino delgado tiene como principal función la absorción de nutrientes. Está ubicado entre el estómago y el intestino grueso y se divide en tres regiones macroscópicamente diferenciadas: el duodeno, el yeyuno y el íleon. La pared del intestino está formada de cuatro capas concéntricas: la serosa, la muscular, la submucosa y la mucosa. La mucosa intestinal es la más importante ya que en ella tiene lugar la digestión y absorción de nutrientes y es donde se encuentra el sistema linfoide asociado (MALT). Está constituida por el epitelio y por la lámina propia, que es el tejido conjuntivo laxo ubicado entre el epitelio y la submucosa.

*El epitelio.* Está formado por células polarizadas adheridas entre sí, dando lugar a una capa celular que reviste la superficie del tejido. Los epitelios no están vascularizados y se abastecen de las secreciones del tejido conectivo. Las células epiteliales intestinales son la frontera entre la mucosa y la cavidad intestinal. Conforman las *vellosidades* intestinales, que con un tamaño de entre 0.5 y 1.5 mm, presenta un aspecto de hoja en el duodeno y en el íleon tiene forma digitiforme. Las vellosidades se continúan en la mucosa con las glándulas intestinales o *criptas de Lieberkühn*. En la cripta hay células con alta tasa de replicación que se desplazan hacia la vellosidad sustituyendo continuamente sus células (**figura 2.1**).

<sup>6</sup>*Evolución de la Teoría de reconocimiento de estructuras propias y ajenas. (Self and Non-self). Desde 1959 con la teoría de Burnet sobre la presencia de receptores en las células B capaces de reconocer estructuras propias y foráneas, pasando por la necesidad de la célula “h” para impedir la autoreactividad propuesta por Brescher y Cohn (1969), hasta los modelos más recientes de discriminación basados en el reconocimiento de moléculas foráneas a través de PRR (Janeway 1989, Infectious–non self theories) o de señales de peligro (P. Matzinger 1994) (47) se intenta explicar cuándo una respuesta debe comenzar.*

El epitelio está formado por células especializadas: a) Las *células de Paneth*, ubicadas en la base de la cripta, están especializadas en el almacenamiento y secreción de péptidos antimicrobianos. Entre estos se encuentran la fosfolipasa 2, la lisozima y las defensinas HD5 y HD6. Recientemente se ha encontrado expresión de tripsina en estas células, involucrada en la activación de defensinas. La tripsina también podría actuar sobre un receptor de proteasas (PAR-2), una proteína G. Como consecuencia de la proteólisis de PAR-2, se genera un ligando capaz de inducir Inositol 1,4,5-trifosfato y la secreción de Prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) y  $F_{1\alpha}$  y ácido araquidónico (48). La  $PGE_2$  tienen efectos inmunomoduladores. Los gránulos de secreción presentes en las *células de Paneth* son acidófilos y están en la parte basal del citoplasma. Estas células son de renovación relativamente lenta. b) *células caliciformes* son menos abundantes en el duodeno y más en el íleon. Producen glicoproteínas que lubrican y protegen el epitelio; c) *células absorbentes o enterocitos*: Su función principal es la absorción de nutrientes. Las microvellosidades tienen enzimas que hidrolizan disacáridos y péptidos. Entre ellas se encuentra el CD26, una dipeptidil peptidasa (IV). Los enterocitos al igual que las células M pueden transportar antígeno transcelularmente o a través de las uniones estrechas que forman entre sí (transporte paracelular). En la EC existe una pérdida importante de células absorbentes y un incremento en la proliferación de las células de la cripta. d) *células M (Microfold epithelial cell)*: Son células epiteliales ubicadas sobre las Placas de Peyer. Están especializadas en el transporte transcitoplasmático de antígenos solubles y particulados (49). Son muy escasas y se ha demostrado que unen patógenos como Salmonella, Shigella, Yersinia y retrovirus.

## 2.2 Estructura del GALT

El tejido linfoide<sup>1</sup> asociado a mucosas se conoce con el nombre genérico de MALT (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue*). Según el tipo de mucosa recibe un nombre diferente. BALT (*Bronchial associated Lymphoid Tissue*) se denomina al asociado a la mucosa respiratoria y GALT (*Gut Associated Lymphoid Tissue*) al sistema linfoide asociado a la mucosa intestinal.

El GALT está integrado por: las *Placas de Peyer*, (PP) , los *ganglios linfáticos mesentéricos* (MLN), los *linfocitos de la lámina propia* (LPL) y los *linfocitos Intraepiteliales* (IELs) (50). Estos componentes definen dos compartimentos funcionales diferentes según su papel dentro de la respuesta inmune: uno de inducción de la respuesta (PP y MLM) y otro sitio (el epitelio y en la lámina propia) donde se lleva a cabo la respuesta efectora mediado por los LPL e IELs .

### 2.2.1 Placas de Peyer (PP)

A lo largo de todo el intestino existen acumulaciones linfoides, que aumentan en frecuencia en la zona distal del íleon y en el colon, donde la microflora es más diversa. En la *parte terminal del íleon*, estas acumulaciones se agrupan en estructuras más grandes formando las PP. Las PP tienen estructura de órganos linfoides secundarios, con zonas definidas de células B y T, aunque domina la zona B. En ellos tiene lugar la activación de células B productoras de IgA. Las PP se encuentran separadas del lumen por epitelio especializado o epitelio asociado al folículo (FAE) y

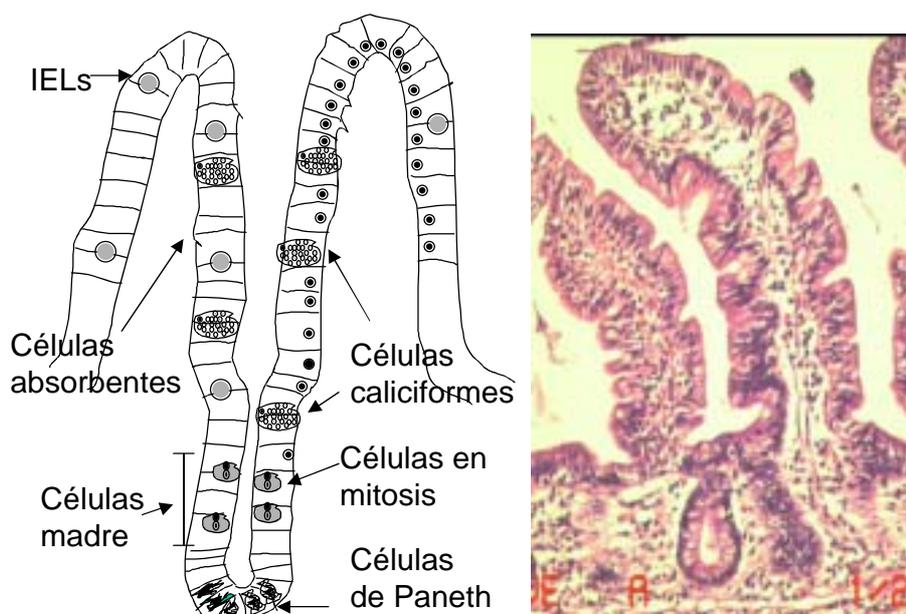
por una zona debajo del epitelio conocida como cúpula subepitelial, *Subepithelial Dome* (SED). Las células epiteliales del FAE se diferencian del resto por poseer menos enzimas digestivas y porque el característico ribete en cepillo es menos pronunciado. Dentro del FAE están las células M. El desarrollo de las Placas de Payer es dependiente de Linfotóxina  $\alpha 1\beta 2$  ( $\alpha 1\beta 2$ ) que actúa vía el receptor de la Linfotóxina B (LT $\beta$ R), expresado en las células del mesénquima VCAM<sup>+</sup>.

### 2.2.2 Ganglios linfáticos Mesentéricos (MLN).

Los MLN drenan a través de los capilares linfáticos de las PP y las acumulaciones linfoides del MALT. En los MLN, además de ocurrir la respuesta inmune específica, las células B activadas en las PP terminan de diferenciarse a plasmocitos. Recientemente se ha visto que en ratones atímicos, o en condiciones de linfopenia aguda, también es un sitio de linfopoyesis, particularmente de células T  $\gamma\delta$  (ver apartado 3.5, página 51) (51).

### 2.2.3 Linfocitos de Lámina Propia (LPL).

Distintas células leucocitarias se encuentran distribuidas a lo largo de la lámina propia, incluyendo células dendríticas, macrófagos y linfocitos B y T (LPL-Linfocitos de Lámina Propia). Los linfocitos T son predominantemente TCR  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. También se encuentran en la lámina propia células plasmáticas productoras de IgA, aunque también de IgG, e IgM. Los macrófagos y células dendríticas de la lámina propia estarían involucrados en la presentación de antígeno *in situ*.



**Figura 2.1:** Células epiteliales que conforman la cripta y la vellosidad

### 2.2.4 Linfocitos Intraepiteliales (IELs)

Los Linfocitos Intraepiteliales (IELs) son una población de células T que se encuentran ubicadas en el epitelio, adheridas a la superficie basolateral de los enterocitos. Por tratarse del tema principal de este trabajo, sus características fenotípicas y funcionales serán descritas en la tercera parte de la introducción (página 35).

Los leucocitos que conforman el GALT están en continuo tránsito entre la periferia y la mucosa. La recirculación linfocitaria es de vital importancia para asegurar el encuentro entre las células inductoras y efectoras de la respuesta inmune, así como para la correcta compartimentalización del sistema inmune de mucosa.

### 2.3 Tránsito linfocitario en la mucosa

La recirculación linfocitaria no es un proceso aleatorio. Requiere pasos de interacción con los endotelios y entrada a través de éste a los tejidos. Estos pasos están regulados por la expresión diferencial de moléculas de adhesión y quimiocinas, factores solubles capaces de modular, inducir y dirigir la migración de los leucocitos.

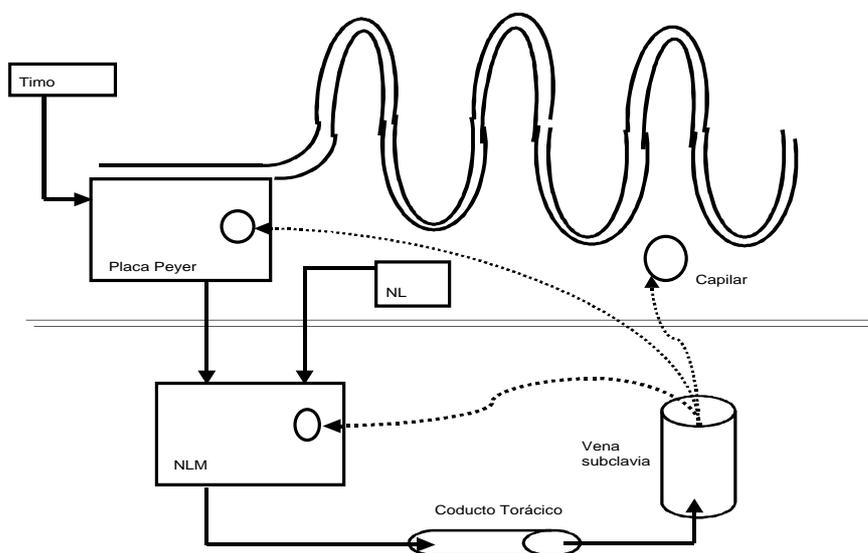
*Desde el timo a la mucosa.* Los linfocitos T una vez que dejan el timo como células T maduras se dirigen a los tejidos linfoides secundarios ubicándose en las zonas paracorticales. La recirculación de estos linfocitos vírgenes es continua entre los órganos linfoides secundarios. La mayoría de los linfocitos maduros recirculan por los tejidos con una frecuencia de una a dos veces por día. Estos se activarán en caso de una respuesta específica. Los linfocitos *activados* pasarán a formar parte del grupo de células *efectoras* que se dirigen hacia los órganos linfoides terciarios o zonas efectoras extralinfoides. También podrán recircular como células memoria por los órganos linfoides secundarios y hacia los centros germinales donde colaborarán con los linfocitos B en la producción de Ac (**figura 2.2**)(52).

*¿Cómo llegan los linfocitos T al intestino?* Los órganos linfoides secundarios drenan en el *ducto torácico*<sup>7</sup>. Ensayos de transferencia de células del ducto torácico muestran que los blastos (células activadas) presentes en el mismo se dirigen mayoritariamente a la pared intestinal y a los órganos linfoides asociados mientras que los linfocitos pequeños recirculan por los órganos linfoides secundarios. En el ducto torácico se encuentran linfocitos T  $\alpha\beta$ , CD8 $\alpha\beta$  y CD4, presentes tanto en epitelio (IELs) como en la lámina propia (LPL). No se han detectado en el ducto torácico poblaciones CD8 $\alpha\alpha$  ni T  $\gamma\delta$ . Es decir que los IELs y LPL derivados del timo son la progenie de los

<sup>7</sup>Sistema linfoide: es un sistema de drenaje que recoge fluido intersticial de todo el cuerpo y lo devuelve a la sangre. Los capilares linfáticos que salen de los tejidos convergen en estructuras más grandes (vasos linfáticos) que desembocan en el ducto torácico. Este ducto comienza a la altura de la segunda vértebra lumbar en la cisterna de chili. Esta especie de saco recoge la linfa proveniente de los ganglios inferiores y del sistema digestivo (capilares linfáticos del intestino y linfáticos mesentéricos). El ducto desemboca en la vena subclavia izquierda. En el ducto torácico se encuentran principalmente linfocitos pequeños y un porcentaje pequeño de blastos.

blastos que circulan por el ducto torácico. Algunas de estas poblaciones son oligoclonales, existiendo algunos clones con idéntico TCR en epitelio, lámina propia y ducto torácico (53). ¿Por qué un linfocito virgen va a la Placa de Peyer y no a la lámina propia? La razón de esta direccionalidad parece ser la expresión diferencial de la integrina  $\alpha 4\beta 7$ . La expresión de MadCAM en las vénulas postcapilares de la lámina propia permite que los linfocitos (memoria/efectores) con alta expresión de  $\alpha 4\beta 7$  interactúen con dicha molécula. Por el contrario, los T vírgenes expresan poco  $\alpha 4\beta 7$  y las vénulas postcapilares carecen además del ligando de L-selectina (CD62L), necesario para el primer contacto de los linfocitos con las Vénulas de Endotelio Alto (HEV) de las placas de Payer.

¿Dónde se estimulan? La estimulación de los blastos que aparecen en el ducto torácico y que luego darán las poblaciones de IELs y LPL, ocurre principalmente en las PP, MLN y en menor medida en el bazo (53). Tras la activación de células T que se induce en condiciones de rechazo de injerto contra huésped, se produce un incremento de blastos en las PP que se dirigen al ducto torácico. Si el ducto es drenado, se reduce el incremento de blastos a lo largo de todo el intestino. Sin embargo, se ha observado en ratones carentes de PP y MLN por mutaciones en el receptor de  $LT\beta$  ( $LT(\beta)R$ ) o en el locus de  $TNF/LT\alpha$ , tienen niveles normales de Linfocitos T  $\alpha\beta$   $CD4^+$  y  $CD8^+$  en el intestino, lo que *a priori* indicaría que la activación de los IELs y LPL en dichos sitios no sería necesaria para su ubicación en el epitelio o lámina propia. Esto podría explicarse gracias a la presencia de células dendríticas diseminadas en la mucosa que alcanzan el ducto torácico y el bazo y que estimularían a estas poblaciones T dependientes que luego, como células activadas se ubicarían en la LP y en el epitelio. Las células efectoras de la mucosa pueden seguir recibiendo estimulaciones y realizar nuevos ciclos de circulación.



**Figura 2.2:** Recirculación linfocitaria en la mucosa. Los MLN drenan a través de los linfáticos aferentes linfocitos provenientes de las PP y acumulaciones linfáticas. Los linfocitos T  $\alpha\beta$ ,  $CD8$   $\alpha\beta$  y  $CD4^+$  pasan de los MNL a la sangre vía el ducto torácico. Un pequeño porcentaje de blastos se distribuyen por el epitelio y la LP a través de capilares MadCAM-1<sup>+</sup>. El resto recircula por las PP, acumulaciones linfáticas, MNL o se dirigen hacia el bazo. Basado en (53).

Si bien hace años se suponía que algunas poblaciones de IELs, como las células T  $\gamma\delta$  en ratón, podrían ir directamente desde el órgano linfoide primario hacia la mucosa intestinal esto parece que no es correcto. Recientemente se ha visto que la colonización del epitelio no ocurriría luego de la maduración tímica (51).

*El microambiente como factor de localización de Linfocitos T.* Para que un linfocito se quede en un tejido determinado ha de seguir unos procesos similares a los que le permitieron pasar desde la circulación al mismo. Es decir que dentro del mismo tejido ocurrirán la regulación de la expresión de moléculas, fenómenos de adhesión y eventos de migración. Por ejemplo, el epitelio intestinal produce TGF- $\beta$  que aumenta la expresión de  $\alpha^E\beta 7$  en los IELs permitiendo su unión a las células epiteliales a través de la E-cadherina.

De la correcta migración de las células B y T a la mucosa, dependerá la síntesis de Ig en la mucosa.

## 2.4 Síntesis de IgA

La respuesta humoral que predomina en la mucosa se caracteriza por la alta producción de IgA (40 mg/kg en humanos por día). Los linfocitos B productores de IgA se activan principalmente en las PP. En el centro germinal es donde se produce la proliferación celular, el cambio de isotipo y la hipermutación somática. El contacto con células T y células dendríticas inducen la expresión particular de IgA (54). Desde las PP, las células B se dirigen a los MLN, donde terminan de proliferar y de diferenciarse a células plasmáticas (células B efectoras)<sup>8</sup>. Luego se distribuyen a lo largo de la lámina propia a través del *ducto torácico* y de la sangre. Las células plasmáticas productoras de IgA están ubicadas principalmente en la LP de la mucosa intestinal.

Las IgA secretadas por las células plasmáticas de la lámina propia se transportan hacia el lumen intestinal a través del epitelio. Este transporte transcelular comienza con la unión entre la cadena J (que dimeriza a las IgA) con el receptor polimérico de la Ig en la superficie basal de las células epiteliales. La IgA es transportada hacia el lumen y secretada en forma de dímero luego de que dicho receptor es cortado enzimáticamente, dando lugar al denominado componente secretorio. La carencia selectiva de IgA es una de las inmunodeficiencias humorales más comunes en humanos. Como se ha mencionado anteriormente, la producción de autoanticuerpos contra la Transglutaminasa (anti-TG) de isotipo IgG e IgA son característicos de la EC y un indicio para que la enfermedad se considere de tipo autoinmune.

<sup>8</sup>Seguimiento de un linfocito B específico. Una forma fácil de seguir las células B específicas para un antígeno es mediante el marcaje de sueros inmunes (específicos de una toxina p.e, cólera) con fluoresceína. Luego las células específicas del tejido se incuban con la toxina y el antisuero. Lectura Recomendada: *Cellular kinetics of the intestinal immune response to cholera toxoid in rats.* 1975. *JEM* vol142 (55).

## 2.5 Autoinmunidad: es la EC una enfermedad autoinmune?

Las enfermedades autoinmunes, que afectan a un 3-5% de la población, son consecuencia de una respuesta inmune frente a estructuras propias. Para que una enfermedad pueda ser catalogada como autoinmune, debe cumplir los postulados de Witebsky (56). Primero, deben existir indicios clínicos de la enfermedad, como autoanticuerpos, alteración histológica del órgano afectado, y evidencias de ensayos in vitro que comprueben reacciones de reconocimiento de estructuras o antígenos propios; segundo, existencia de un modelo animal que permita reproducir la enfermedad y tercero, debe ser transmisible, en un modelo animal, por transferencia de Ac o células T autoreactivas (en humanos un modelo sería el de la Myastenia Gravis o la enfermedad de Graves, por transferencia de auto-Ac via fetal). Existen además factores genéticos y ambientales que participan directamente en el desarrollo de este tipo de enfermedades (57). La EC no cumple con todos los postulados. Existen indicios clínicos que sugieren que se trata de una enfermedad de tipo autoinmune, pero ya que es una enfermedad que sólo ocurre en humanos, es difícil determinar que tipos celulares están implicados en patogénesis de la EC.

Las enfermedades autoinmunes sistémicas y órgano específicas se producen cuando se alteran los mecanismos implicadas en la inducción y regulación de la respuesta inmune. Cualquier perturbación en los puntos de control que intervienen en el desarrollo de la respuesta podrían generar una reacción indeseada frente a antígenos propios.

## 2.6 Tolerancia<sup>9</sup>. Mecanismos: delección clonal, anergia y supresión activa

La tolerancia es un proceso activo que lleva a un linfocito a no reaccionar frente a un antígeno. Se llama tolerancia central al proceso de selección y delección de clones autorreactivos que ocurre en el timo y en la médula ósea para los linfocitos B. La tolerancia periférica es la falta de respuesta de un linfocito maduro y se basa en mecanismos que mantienen controladas las posibles respuestas autoinmunes en periferia. Los primeros estudios sobre tolerancia comienzan en la década de los 60, con los experimentos de Medawar, que demostraron que la inmunización con células de un donante alogénico a edad temprana, evitaba el posterior rechazo de injertos de piel del mismo donante.

Sobre la generación aleatoria del repertorio TCR actúa el principal proceso de control de autoreactividad, la selección tímica. Si este sistema falla, se liberarán células T autoreactivas que pueden desencadenar autoinmunidad. Las células autoreactivas no necesariamente han de ser

<sup>9</sup>Tolerancia: Hace referencia a un proceso activo que lleva a un linfocito a no reaccionar frente a un antígeno. Tolerancia central: Proceso de selección y delección de clones autorreactivos que ocurre en el timo. Tolerancia periférica: Falta de respuesta de un linfocito maduro. Tolerancia oral: Respuesta no funcional o hiporespuesta inducida tras la administración oral de un antígeno. Los primeros estudios sobre tolerancia comienzan en la década de los 60, con los experimentos de Medawear que demostraron que la inmunización con células del donante a edad temprana, evitaba el posterior rechazo de injertos de piel.

patogénicas, por eso es necesario diferenciar entre una respuesta autoinmune y una enfermedad autoinmune. Se ha visto que durante el proceso de selección tímica se producen células reguladoras implicadas en la supresión de ciertas patologías autoinmunes. Es decir, que si bien el proceso de selección tímica es de vital importancia en la delección de células autoreactivas, también juega un papel importante en la generación de células reguladoras que previenen el desarrollo de la autoinmunidad y posiblemente de otros procesos inmunológicos (58). La generación de células autoreactivas residentes, puede ser un mecanismo de control frente a alteraciones producidas en órganos periféricos por agentes tóxicos (59).

Además de la *tolerancia central* que se genera en el timo, existen mecanismos de mantenimiento de la tolerancia en periferia, en lo que se llama *tolerancia periférica* (60). Estos mecanismos controlan las respuestas a antígenos específicos de tejido o que se expresan en distintas etapas del desarrollo. Muchos de los antígenos que se encuentran en la periferia no se expresan en el Timo. Es decir que debe existir un mecanismo responsable de controlar los Linfocitos autoreactivos que escaparon a la selección tímica.

#### *Mecanismos implicados en la tolerancia periférica.*

Existen evidencias de varios mecanismos responsables de la *tolerancia periférica*: *ignorancia del antígeno*, *delección clonal*, *la anergia* y *la supresión o regulación activa* (61).

Existen linfocitos autoreactivos, que en condiciones normales *ignoran* el antígeno expresado en el tejido. Esta ignorancia puede deberse a un nivel bajo de expresión de antígeno, a la falta de Th incapaces de inducir una respuesta, o a la falta de moléculas coestimuladoras en las células del tejido.

El mecanismo de *delección clonal* raramente ocurre *in vivo*, y está más restringido a la tolerancia central. Se da en modelos experimentales de ratones con un TCR transgénico que se alimentan con altas dosis de antígeno (OVA o MBP) generándose en el GALT y en el bazo la delección antígeno específica de células T. También puede ocurrir cuando la presentación de un antígeno se da en ausencia de coestimulación, cuando faltan los factores necesarios para el crecimiento de un Linfocito T o con la muerte por apoptosis mediada por FAS.

La transferencia de células T CD8+, específicas de OVA en ratones transgénicos que expresan la proteína en las CE intestinales no producen daño del epitelio, aunque si se expanden en las PP, MLN, LP y IELs (62). Sin embargo, tras la infección con VSV-ova se induce un daño de las CE mediado por las CD8 específicas de Ova. Es decir que la sola expresión de un antígeno en las CE induce tolerancia y esta se rompe tras la inflamación que produce la infección con el virus. Este es un caso sobre el cual actuaría la delección de la células T específicas, ya que pasados 17 días de la inoculación, no se observan en PP, NLM, LP ni epitelio.

La generación de *anergia* (inactivación funcional) clonal predomina en periferia sobre la deleción clonal. Las células anérgicas son capaces de reconocer antígeno pero no producen respuesta inmune. Se vio que tras la inoculación de ratones con células con un TCR transgénico, estos linfocitos T Ag específicos persisten luego de la administración de OVA, pero no responden frente a la reestimulación *in vitro*. El suministro exógeno de IL-2 puede revertir este proceso (61).

El proceso de inducción de *células T supresoras (supresión activa)* es desconocido pero es particularmente importante en las mucosas. La respuesta en la mucosa sería el balance de dos procesos independientes, la respuesta T supresora por un lado y la respuesta inmunogénica (Th1/Th2) por otro(63). Estos mecanismos de *supresión* juegan un papel importante en el control de la reactividad, pero existen células T activamente involucradas en la *supresión y/o regulación* de procesos inmunológicos perjudiciales (autoinmunidad, hipersensibilidad, etc).

En las mucosas existen mecanismos de tolerancia periférica particularmente activos. Se denomina tolerancia oral a la ausencia de respuesta o hiporrespuesta inmune frente a antígenos que han sido administrados por vía oral. Todos los mecanismos de tolerancia periférica están activados en la mucosa, aunque es de destacar la presencia de células supresoras. La supresión se originaría en los folículos de la mucosa, en particular las Placas de Peyer, donde existen células capaces de producir TGF- $\beta$ . Este proceso, si bien es independiente de la generación de citoquinas de tipo Th2 (IL-4), estaría favorecido por las mismas e inhibido por IFN- $\gamma$ .

Las células reguladoras pueden aumentar o suprimir una respuesta inmune. Cuando se da este último caso se habla de linfocitos T supresores (reguladoras supresoras).. Un caso ejemplificador es el que ocurre con las células Th3 productoras de TGF- $\beta$ . Si la producción de TGF- $\beta$  sirve para suprimir la proliferación, se habla de células supresoras mientras que si sirve para inducir el cambio de isotipo hacia IgA, se habla de regulación.

Entre las células<sup>10</sup> (reguladoras/supresoras) involucradas en los mecanismos de supresión activa que tienen lugar en las mucosas están las *Tr1*, *Th3* y las *CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>*.

*Células Tr1*: Son células T antígeno específicas productoras de altos niveles de IL-10<sup>11</sup>. No producen IL-2 ni IL-4 (50). En 1997, Groux y colaboradores demostraron que la estimulación repetida *in vitro* de células CD4<sup>+</sup> de bazo provenientes de un ratón transgénico para un péptido de Ovoalbumina (OVA) y en presencia de IL-10, generaba una población reguladora (Tr1), capaz de impedir el desarrollo de colitis inducida por la transferencia de células CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>++</sup> (64). Estas mismas células se pueden aislar en humanos tras estimulaciones alogénicas continuas en presencia de IL-10. *In vitro*, el cocultivo de estas células con otras células T *suprimen* su proliferación. Este efecto es en parte revertido con Ac anti-IL-10 y anti-TGF- $\beta$ . Este mecanismo de inhibi-

<sup>10</sup>*Células Tr1: Son células T antígeno específicas productoras de altos niveles de IL-10. No producen IL-2 ni IL-4 (50). Th3: Son células T CD4<sup>+</sup> productoras de TGF- $\beta$  que se aíslan de nódulos linfáticos mesentéricos tras administración oral de antígenos a bajas dosis. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>: Son células derivadas del timo que a través de mecanismos moleculares no muy claros, median activamente la inhibición de las células T (autoreactividad, síntesis de citoquinas) (67).*

ción es conocido con el nombre de “*bystander suppression*” (las células T tolerizadas frente a un Ag, secretan citoquinas supresoras, pe. TGF- $\beta$ , que actúan sobre las células del entorno, frenando la respuesta frente a otro Ag). *In vivo* se desconoce si su efecto sería sobre la proliferación, el reclutamiento o sobre las funciones efectoras de las células patogénicas incluidas dentro de las CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>++</sup>. Tampoco se sabe si el mismo mecanismo de supresión observado *in vitro* se daría *in vivo*, es decir si se requieren interacciones celulares entre las poblaciones reguladoras y efectoras o si el efecto supresor es únicamente debido al efecto de las citoquinas inmunomoduladoras (IL-10, TGF- $\beta$ ). Estas Tr1 generadas *in vitro*, podrían ser las CD45RB<sup>lo</sup> naturalmente encontradas *in vivo* (65). Células CD4<sup>+</sup>RB<sup>lo</sup> previenen la generación de colitis cuando se las coinyectan con las CD4<sup>+</sup>RB<sup>hi</sup> inductoras de la enfermedad. Estas células no previenen la colitis si se aíslan de ratones KO para IL-10.

Células Th3: Th3: Son células T CD4<sup>+</sup> productoras de TGF- $\beta$  que se aíslan de nódulos linfáticos mesentéricos tras administración oral de antígenos a bajas dosis. En el año 1994, en el modelo de EAE (encefalitis autoinmune experimental) se describen un tipo de células productoras de TGF- $\beta$  que impedían la inducción de la enfermedad por MBP o PLP (66). Estas células T CD4<sup>+</sup> productoras de TGF- $\beta$  se aíslan de MLN tras la administración oral de antígenos a bajas dosis.

Células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> son otra población a las que se atribuye la *supresión* activa de autoreactividad. Son células derivadas del timo que a través de mecanismos moleculares no muy claros, median activamente la inhibición de las células T (autoreactividad,

<sup>11</sup> **IL-10.** Descubierta en el año 1989. Cytokine synthesis inhibitor factor (CSIF), Mast cell growth factor (MCGF-III), B cell derived-T cell growth factor (B-TCGF). Proteína de la familia de las citoquinas de cadena larga (IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha/\beta$ ). Cromosoma 1:1q. Homodímero, 160 aa (178 con péptido señal). Producido por: células T vírgenes y memorias (Th<sub>1</sub>, Th<sub>2</sub>, Tr<sub>1</sub>), Macrófagos, células B transformadas con Epstein-Barr virus, células NK. Receptores: De la familia del IFN. Función: Inhibe respuesta Th<sub>1</sub>, principalmente la producción de IFN- $\gamma$ . Inhibe la síntesis de citoquinas proinflamatorias (IL-1a, IL-1b, IL-6) producidas por monocitos y neutrófilos y otras citoquinas como la misma IL-10, IL-12, GM-CSF, MIP1- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) producidos por monocitos y células dendríticas. Actúa como factor de crecimiento en células B y mastocitos. Disminuye la expresión de moléculas activadoras y coestimuladoras en monocitos y células dendríticas. La producción de IL-10 es inducida por la misma citoquina y por otras citoquinas como la IL-12, IL-4 y IFN- $\alpha$ . La síntesis de IL-10 en macrófagos inducida por LPS es aumentada por el TNF- $\alpha$  y por inductores del AMPc, como la prostaglandina (PGE<sub>2</sub>), la epinefrina, histamina, péptido intestinal vasoactivo e inhibido por la IL-4, la IL-10 misma, IL-13, IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$ . Incrementa la expresión de CCR5 en monocitos. Inhibe la expresión de MHC clase II en monocitos. Aumenta la expresión de HLA-G en trofoblastos y monocitos. Inhibición *in vitro*: La IL-10 inhibe la proliferación de células T antígeno específicas y la liberación de citoquinas por un efecto modulador en las APC. Este efecto se bloquea con Ab anti-IL-10 o TGF- $\beta$ . La inhibición es inherente a las células Tr1 productoras de IL-10 (65). También tiene un efecto directo sobre la misma célula T inhibiendo la producción de IL-2 y TNF- $\alpha$ . La activación en presencia de IL-10 puede producir un efecto de anergia en los linfocitos T. Inhibe la expresión (inducida por IL-2) de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  por células NK, a través de un efecto indirecto sobre los monocitos inhibiendo la producción por estos, de IL-12 e IL-1. La presencia de IL-10 en bajas cantidades inhibe la formación de ciertas metástasis y la aparición de infiltrado NK. Ratones knockout para IL-10 tienen un desarrollo normal de leucocitos, pero desarrollan enterocolitis, por una desregulación de la respuesta Th1 por falta de IL-10 (75). Inhibición *in vivo*: La transferencia de células naïve CD45 RB<sup>++</sup> que producen altos niveles de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  genera enfermedad intestinal inflamatoria (IBD). La enfermedad se previene con la co-administración de T CD45 RB low, productoras de IL-4 e IL-10 (Tr1 productoras de IL-10) específicos de OVA (64). Esta inhibición no es específica ya que suprime la respuesta Th1 específicos de antígenos bacterianos (no de OVA)(*bystander suppression*).

síntesis de citoquinas) (67). El efecto principal de estas células sería el de reducir/inhibir la expresión de IL-2 en las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>. *In vitro*, el efecto supresor requiere la activación de las células supresoras, el contacto entre ésta y la efectora, y no es mediado por citoquinas. El efecto se inhibe con adición de anti-CD28, lo cual sugiere que estarían actuando sobre la señal coestimuladora (68). Sin embargo, las CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, pueden inducir supresión de síntesis de citoquinas en un sistema libre de APCs. Es la única población en ratón que expresa constitutivamente CTLA-4. Se desconoce si el CTLA-4 está involucrado en la función reguladora de esta población. Su efecto supresor parece ser independiente de IL-4 e IL-10. Si bien el papel del TGF-β es más controvertido, son más el número de evidencias que descartan un papel activo en la supresión (69), aunque recientemente el grupo de Strober otorga al TGF-β un papel importante en la supresión mediada por estas células *in vivo*, ya que no impiden el desarrollo de colitis si proceden de ratones TGF-β<sup>-</sup>, aunque sí lo hacen *in vitro* (70). Es decir, los mecanismos *in vivo* pueden ser diferentes a los observados *in vitro*. Recientemente, se ha demostrado su capacidad de curar la colitis inducida por la transferencia de CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>++</sup> en ratones (71). Su ubicación en los NLM, juntamente con células CD11c<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>++</sup>, sugieren que el efecto regulador de estas células sería a través de la interacción directa entre los dos tipos de células T.

Existen otros tipos de células reguladoras como las supresoras CD8<sup>+</sup> o las TCRγδ. La transferencia de células TCRγδ provenientes de animales previamente tolerizados con antígeno vía oral induce tolerancia (72,61). En ambos casos, su función y características no están muy definidas.

Si bien la supresión y/o tolerancia están generalmente vinculadas a la producción de dos citoquinas, la IL-10 y el TGF-β, hasta el momento no se ha visto un efecto directo de estas en el proceso de diferenciación o en la función efectora de las células T reguladoras. Aún queda por resolver si las Treg actúan a través del contacto célula-célula o a través de mediadores solubles, qué marcadores las diferencian, qué antígenos reconocen y sobre qué tipo de células actúan.

Otros mecanismos no específicos capaces de impedir respuestas inflamatorias pueden influir en el mantenimiento de la tolerancia. Uno de ellos es el mediado por metabolitos del ácido araquidónico producidos por la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (ver más adelante: modelo animal de la enfermedad celíaca)

Los linfocitos T y B son los mediadores de la respuesta inmune, pero de la presencia de células dendríticas dependerá la correcta diferenciación de las mismas (73). La secreción de citoquinas por parte de las CD (y células T) condicionará en muchos casos el resultado final, es decir, la polarización hacia una respuesta de tipo Th1 o Th2 (74). Algunas enfermedades tienen una clara asociación con la presencia de determinadas citoquinas, como ocurre con las Enfermedades Inflamatorias Intestinales.

## 2.7 Enfermedades inflamatorias de la mucosa intestinal

Las enfermedades inflamatorias intestinales (IBD) incluyen patologías crónicas recurrentes cuya causa y origen son desconocidos. Dos de estas enfermedades<sup>12</sup> afectan al intestino grueso: la enfermedad de Crohn (CD) y la Colitis Ulcerosa (CU). El infiltrado presente en la mucosa afecta la superficie intestinal en la CU y a toda la pared en la CD. La hipótesis sobre la causa de estas enfermedades sería una respuesta inmune incontrolada frente a antígenos de la flora bacteriana, originada por factores ambientales y con factores genéticos que favorecen su desarrollo (76,77).

Existen varios modelos animales que permiten estudiar estas enfermedades. Entre ellos se encuentran los animales que *desarrollan espontáneamente* la enfermedad y que permiten analizar los factores genéticos asociados a su aparición. Otros modelos se pueden inducir mediante la administración de *agentes exógenos, o mediante la transferencia de células inmunocompetentes* capaces de generar la enfermedad en ratones sin sistema linfóide (SCID or RAG<sup>-/-</sup>). Finalmente aquellos animales modificados genéticamente, ya sea por transferencia o por delección de un gen particular (citoquinas, TCR) pueden desarrollar la enfermedad (78).

En modelos de transferencia de células CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>hi</sup> a ratones SCID, en animales KO de IL-10, IL-2 o TCR $\alpha/\alpha$  o tras la administración TNBS (ácido trinitrobenzen sulfónico), se observa un infiltrado T CD4<sup>+</sup> en la mucosa. La inmunopatología de este infiltrado estaría asociado a la producción de citoquinas Th1 (TNF- $\alpha$ <sup>13</sup> e IFN- $\gamma$ <sup>14</sup>). Estas citoquinas proinflamatorias contribuyen a la activación de los macrófagos, quienes incrementan la síntesis de IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  y metabolitos derivados del óxido nítrico (ON). El TNF- $\alpha$  contribuiría al daño producido en el epitelio y a la formación de granulomas, característicos en la histología de la enfermedad de Crohn. La importancia del TNF- $\alpha$  queda reflejado por el efecto que produce el tratamiento con Ac's anti-TNF- $\alpha$  en la mejora y a veces remisión de la enfermedad. El ON a concentraciones elevadas tendría un efecto tóxico, alterando la función proteica y la permeabilidad del epitelio. La presencia temprana de células productoras de IFN- $\gamma$  o IL-12 y o la disminución de IL-4 o IL-10 afectaría la polarización hacia la respuesta Th1. En la polarización temprana de células Th<sub>1</sub> pueden intervenir factores de transcripción específicos, como el caso de T-bet, expresado en células Th<sub>1</sub> y no en Th<sub>2</sub> que induce un incremento de IFN- $\gamma$  y reprime la expresión de IL-4 (74).

El efecto inflamatorio de los T CD4<sup>+</sup>, sería controlado en condiciones normales por poblaciones de células T reguladoras, productoras de TGF- $\beta$  (Th3) o de IL-10 y TGF- $\beta$  (Tr), como se comentó anteriormente (apartado 2.5 Tolerancia).

En otros modelos (TCR $\alpha/\alpha$  y oxazolona), donde la inflamación es más superficial, semejante a la CU, la IL-4 parece ser clave en la patogénesis.

<sup>12</sup>La Enfermedad de Crohn's se caracteriza por la poca secreción de Ac's, por la infiltración de linfocitos T en la mucosa, la formación de granuloma y un perfil de citoquinas de tipo Th<sub>1</sub>. En la Colitis Ulcerosa, prevalece la síntesis de Ac's (ANCA), la infiltración de neutrófilos y perfil de citoquinas tipo Th<sub>2</sub> (79).

## 2.8 Citoquinas y Enfermedad celíaca

Así como en las IBD existe una clara asociación entre la producción de ciertas citoquinas y el desarrollo de la enfermedad, la asociación entre estas y la EC, no es muy clara. No obstante, existen dos modelos animales que sugieren que la falta de IL-10 sería importante en la generación de algunas de las anomalías que aparecen en la mucosa celíaca. Uno de los modelos es el ratón KO de IL-10, en el que en la mucosa del duodeno se observa un agrandamiento de las criptas (75) y el otro el que se induce en ratones transgénicos con un TCR específico de OVA más la administración de un inhibidor de la COX-2 (ver apartado 2.8.7). Hasta el momento sólo un grupo encontró que la IL-10, paradójicamente, está incrementada en los IELs de pacientes celíacos (80). Los resultados son dependientes de la población y/o estrategia utilizada para su determinación.

Uno de los primeros estudios sobre citoquinas en EC demostró mediante técnicas de inmunohistoquímica, que la mucosa de los enfermos celíacos presentaba menor porcentaje de IELs (3.5% v 13.5%) y de LPL (10.3% vs 47.2%) productores de IFN- $\gamma$  que los controles (81). Este dato fue puesto en duda por otro grupo de autores quienes demostraron más tarde por hibridización *in situ*, mayor número de LPL productores de IFN- $\gamma$  en celíacos que en controles, sugiriendo que el balance Th1/Th2 estaría alterado (82). El incremento de citocinas Th1 se demostró en biopsias de mucosa provenientes de enfermos celíacos, que tras la ingestión de proteínas de trigo, a las cuatro horas incrementaban la síntesis de mRNA de IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF- $\alpha$  (83). El incremento de linfocitos en la LP no se correspondería con un aumento en la producción de IL-10 ni de IL-4<sup>15</sup>, ya que en biopsias control y celíacas, hay expresión de ambas citoquinas (hibridización *in situ*) (84). Sin embargo, otro grupo determinó por histoquímica e hibridización *in situ*, que los LPL expresan más IL-4, IL-2 e IFN- $\gamma$  en la mucosa de enfermos celíacos (85).

<sup>13</sup>**TNF- $\alpha$ .** También conocido con el nombre de cachectin o Differentiation Inducing Factor (DIF). **Proteína de la familia del Tumor necrosis factor. (CD40L, CD95L). Cromosoma 6: 6p21.1-p21.3 Homotrímero, 157 aa cada monómero (no glicosilado).** Producido principalmente por macrófagos frente a estímulos inflamatorios, TH<sub>1</sub>, algunos TH<sub>2</sub>, algunos CTL., NK, células dendríticas, endoteliales, etc. Lo producen líneas celulares mieloides como la HL-60, U937, THP-1, linfoblastoides como Raji, Daudi, Jurkat. Receptores: CD120a (TNFR-1) expresado principalmente en epitelio, CD120b, p55, p75. El TNFR-1 contiene un dominio similar al FADD (Fas Associated death domain) Función: Proinflamatoria (fiebre, shock séptico). Inflamación local, activación del endotelio, inducción de la liberación de metaloproteinasas (MMP-1 y MMP-3) por fibroblastos, inducción de la producción de NO en macrófagos. Otras funciones: Aumenta la expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 e IL-6. Su efecto puede ser tanto inmunoestimulante (inducción de IL-15 y diferenciación Th<sub>1</sub> en humanos) como inmunosupresivo (supresión de la proliferación, apoptosis, inducción de citocinas como IL-10, IL-6, TGF- $\beta$ ). Datos de interés: Primera función asociada con la necrosis hemorrágica del tumor. Asociado a enfermedades autoinmunes (enfermedad de Crohn, Artritis reumatoide, esclerosis múltiple). Producción inducida por el mismo TNF- $\alpha$ , por IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-2, GM-CSF y suprimida por el TNF- $\alpha$ , IL-4, TGF- $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-11, IL-13, G-CSF. Aumenta la expresión de ICAM-1 y de ELAM-1 (endothelial leukocyte adhesion molecule 1) aumentando la adhesión de neutrófilos y monocitos. Induce la síntesis de otras citocinas inflamatorias como IL-8, y quimiocinas que regulan la migración, degranulación y estallido respiratorio de neutrófilos. Ratones knockout para TNF- $\alpha$ , presentan desarrollo normal. El timo es normal pero no la estructura del bazo. Menor resistencia a las infecciones y presentan más susceptibilidad los ratones NOD a la diabetes. El efecto del TNF- $\alpha$  sobre la Diabetes en ratones transgénicos es variado. En etapas tempranas se acelera la diabetes en ratones NOD, mientras que en etapas tardías decrece la cantidad de CD8+ autoreactivos. Al igual que la IL-2, tiene efectos tanto anti como pro-apotóticos.

Nilsen y col sugieren un patrón de tipo Th1 con expresión de IFN- $\gamma$  en pacientes no tratados y en biopsias tras desafío de gluten *in vitro*. Tanto en normales como en celíacos encuentran bajos niveles de IL-4 e IL-2 y la expresión de IL-10, IL-5 e IL-12 está por debajo del límite cuantificable (86). Un estudio similar, aunque no cuantitativo, indica que un número mayor de muestras celíacas que normales expresaban, además de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  e IL-2 (87), sugiriendo un patrón de tipo Th1/Th0.

Clones de LPL CD4+ aislados de mucosa celíaca y específicos de gliadina, muestran un patrón Th<sub>1</sub> con producción de IFN- $\gamma$  cuando los péptidos se presentan por DQ2, y un patrón Th<sub>1</sub>/Th<sub>0</sub> (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) cuando lo hacen asociados a DQ8 (88). Otro estudio sobre clones CD4+ específicos de gliadina y restringidos por DQ2, producen mayoritariamente IFN- $\gamma$  aunque algunos también IL-4 (89). Este patrón observado en clones específicos de gliadina, confirmaría los estudios realizados en biopsias de mucosa.

Otras citoquinas estudiadas son la IL-18, cuya forma activa sólo se detectó en biopsias celíacas, indicando que sería responsable de la inducción de la síntesis de IFN- $\gamma$  (90) y la IL-5 que se detectó en eosinófilos infiltrantes de mucosa celíaca, por hibridación *in situ* (91). La expresión del factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) relevante para el crecimiento de las células epiteliales, no parece ser exclusiva de EC (92). A diferencia de lo que sucede con las células T $\gamma\delta$  ubicadas en la piel de los ratones, que sí sintetizan KGF, no se ha visto que sea expresado por IELs ni por LPL. En celíacos se ha descrito un aumento en la expresión de TGF- $\beta$ 1 en la LP, así como de células IL-4 positivas tanto en LP como en el epitelio (93).

La sobreexpresión de IL-15 en la membrana de los enterocitos de enfermos celíacos, sería una de las causas del daño observado en el epitelio, así como de la activación de los IELs (94). Esta citoquina, asociada a la respuesta innata participaría en la activación de las células dendríticas ubicadas en la lámina propia.

Muchas de estas citoquinas participan activamente en la patogénesis de la EC.

**<sup>14</sup>IFN- $\gamma$ .** *Inmune interferón, Type II interferon, T cell interferón. Citoquina de Tipo II. Cromosoma 12 (12q24.1). Homodímero: 143 aa (inmadura 166 aa). Producido por: células T activadas (principalmente Th1), CD8+, NK. Receptores: CD119. Único péptido, con una región extracelular de 200 aa. Presente en casi todas las células, incluidas las plaquetas. Función: Activación de Macrófagos y endotelio (citoquina proinflamatoria) Activación, crecimiento y diferenciación de células Th1 aumentando el factor de transcripción T-bet., células B, NK, células endoteliales, y fibroblastos. Baja actividad antiviral y antiproliferativa. Potencia el efecto antiviral del IFN- $\alpha/\beta$ . Limita el desarrollo de células de tipo Th2. Aumenta la expresión del componente secretorio en enterocitos (receptor de inmunoglobulinas poliméricas) Fue descubierta en 1957 por su actividad antiviral. En 1966 se reportó que sobrenadantes estimulados de linfocitos tenían la capacidad de inducir la activación de macrófagos. Citoquinas como el TNF- $\alpha$ , la IL-12 y el IFN- $\beta$ , inducen o aumentan la producción de IFN- $\gamma$ . Otro coestímulo se produce a través de la interacción de la célula T con la célula presentadora via CD40L-CD40. La transferencia de células T de ratones deficientes en IFN- $\gamma$ , son capaces de inducir colitis. También puede tener un efecto inmunomodulador a través de la inducción de proteínas de la familia de las SOCS (Supressor of citokine signaling.*

## 2.9 Mecanismos inmunológicos de la Enfermedad celíaca

La enfermedad comienza tras la ingestión de alimentos que contienen gliadinas. El epitelio que recubre la mucosa, en condiciones normales, es impermeable a macromoléculas y microorganismos aunque las gliadinas y antígenos en general pueden ingresar en la mucosa por mecanismos de transporte transcelular. Las células especializadas en este mecanismo son las células M. Los macrófagos y células dendríticas adyacentes a estas células M recogerían el antígeno transportado e iniciarían la respuesta adaptativa dentro del órgano linfático (**figura 2.5**). Los enterocitos también transfieren antígenos a la lámina propia mediante el transporte intracelular, que comienza con la endocitosis mediada en algunos casos por receptores específicos ubicados en la región apical (95). En condiciones en la que la permeabilidad del epitelio se ve alterada (inflamación), se incrementaría la entrada de antígenos que llegan por vía paracelular, es decir entre el espacio intercelular (49). Las células dendríticas de la lámina propia migrarían al MLN y activarían células T específicas de gliadina.

<sup>15</sup>**IL-4.** Año 1982. BSF-1 (B cell Stimulating factor-1) o BCGF (B cell growth factor). Proteína de la familia de las Hematopoyetinas (IL-2, IL-5). 4 alfa hélices. Cromosoma 5 (5q23.3-31.2) Ubicada en el mismo cromosoma que la IL-5, IL-13 e IL-3. Homodímero: 129 aa, 20 kDa. Glicoproteína.  
 Producido por: células T activadas (Th-2), CD4+NK1.1+ Natural killer T cell, mastocitos, basófilos y eosinófilos.  
 Receptores: Receptor tipo I CD124 (p140 cadena  $\alpha$ ) asociado a cadena gamma ( $\gamma$ ) del receptor de IL-2.  
 Función: diferenciación de células T a Th2, switch de clase IgG4 (IgG1 en ratón) e IgE, proliferación de linfocitos B activados con anti-IgM. Otras funciones: Regula la expresión de VLA-4 en células T. Reduce la producción de  $Cl^-$  por células epiteliales intestinales.  
 En monocitos produce un aumento de HLA-II, de la expresión de IL-4R $\alpha$ , y disminuye la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-8, IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6. Aumenta la expresión de VCAM-1 en células endoteliales. Transducción de señal: a través de STAT6 y GATA-3 (en ratones). La falta de STAT-6 protege a ratones de la inflamación de tipo Th-2 en el modelo murino de asma. Ratones KO de IL-4 presentan una respuesta Th2 menor, aunque el desarrollo linfocitario y su estado de salud es normal. Tienen una deficiencia en la producción de IgG1 y de IgE. Hay resultados diversos con respecto a la respuesta frente a infecciones parasitarias. Ratones transgénicos que sobreexpresan IL-4 son difíciles de obtener por su elevada toxicidad. Reacciones de hiperreactividad, osteoporosis, aumento de mucus por células de goblet en pulmón, son algunos de los fenotipos. En humanos no se ha establecido una relación directa entre los niveles en suero y una determinada patología. Si hay cierto tipo de asociación entre el polimorfismo del promotor del gen de la IL-4. La inyección de IL-4 en ciertos modelos experimentales como la diabetes en ratones NOD y la encefalitis autoinmune experimental, previenen el desarrollo de las mismas. Ciertos tumores también son eliminados, pero por un efecto en la angiogénesis, más que a un efecto de las células T. La depleción de IL-4 en modelos experimentales de enteropatías por GVHD, previenen la enfermedad.

### 2.9.1 Inmunidad innata e IL-15. Modelo de inducción de la enfermedad.

La unión de toxinas, virus, bacterias a los PRR (Pattern Recognition Receptors) son la señal necesaria para el comienzo de una respuesta rápida (Inmunidad Innata). Uno de estos PRR son los TLR (Toll Like Receptors) que están presentes en el epitelio y células fagocíticas de la mucosa (**figura 2.3**). En modelos de cultivo *in vitro* de biopsias celíacas, se ha visto que ciertos péptidos no inmunodominantes, son capaces de inducir una respuesta innata (46). Un péptido (31-43 de la  $\alpha$ -gliadina), incrementa la expresión de IL-15, COX-2 y la activación de los marcadores CD25 y CD83 en macrófagos de lámina propia. La IL-15 además de producir cambios en las células epiteliales, como la expresión de FAS, TFR (receptor de la transferrina) y Ki 67 (43), es un factor anti apoptótico de los linfocitos T y permite su migración (96). También incrementa la expresión de NKG2D en Linfocitos T CD8<sup>+</sup> (97). Esto puede tener relevancia en el hecho de que pacientes que no responden a una dieta sin gluten (Celiaquía Refractaria) expresan MIC en el epitelio.

### 2.9.2 Reactividad frente a Gliadina

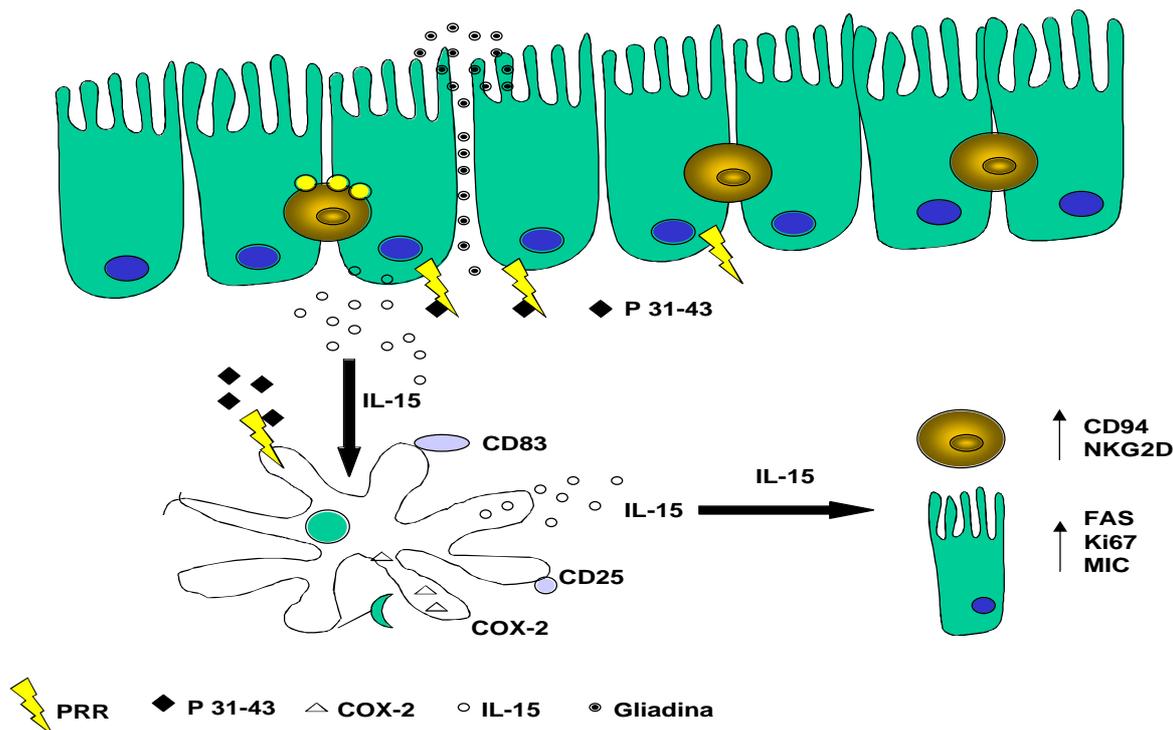
Sabiendo que el gluten (gliadina) es el factor inductor de la EC y la asociación de ésta con ciertos alelos de HLA (DQ2), era previsible encontrar, la presencia de células T capaces de reconocer péptidos derivados de estas proteínas en el contexto de ciertas moléculas de HLA. Estas células específicas se identificaron en PBL (98) y también en la misma mucosa (**figura 2.5**) (37). Las células de la mucosa que reconocían péptidos de gliadina eran linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>-</sup>, con un repertorio variable de TCR $\alpha\beta$ .

### 2.9.3 La Transglutaminasa y la enfermedad. Modelo de neoepítipo TG-gliadina

En el año 1997 Dietrich y colaboradores encuentran que los auto-anticuerpos específicos del endomisio, reconocían una enzima extracelular: la transglutaminasa (TG) (14). La TG cataliza la transaminación o deaminación de glutamina (Gln/Q). La transaminación produce la formación de una nueva unión peptídica entre la Gln de una proteína y un residuo Lisina (Lys/K) de otra. La deaminación en cambio genera ácido glutámico (Glu/E) por pérdida del grupo amino de la Gln.

La identificación de la TG como autoantígeno, significó un paso importante hacia el entendimiento de la patogénesis. En 1998 Sjostrom y colaboradores publican el primer trabajo que demuestra la importancia de la deaminación para el reconocimiento T y presentan el primer epítipo de  $\gamma$ -gliadina reconocido por células T de mucosa (38). Ese mismo año Molberg demostró que la TG desenmascara epítipos de gliadina para que se unan a HLA-DQ2 (39). La deaminación de un péptido sintético de la  $\gamma$ -gliadina (134-153) ocurre en la Gln148, incrementando de este modo su afinidad por la molécula DQ2 (**figura 2.4**).

La presencia de células T específicas de gliadina no explican la generación de Ac anti-TG<sup>16</sup>. Hasta el momento no se han encontrado linfocitos T reactivos contra péptidos de la TG, ya que al ser una enzima constitutiva expresada en muchos tejidos, seguramente estas célula T sean eliminadas durante la selección tímica.



**Figura 2.3:** Modelo de asociación entre la inmunidad innata y la adquirida en el desarrollo de la EC. Péptidos no inmunodominantes de la gliadina (p31-43) reconocen PRR presentes en las células epiteliales y Células Dendríticas de la LP. El reconocimiento de estos PRR por parte de este péptido da la señal de alarma necesaria para iniciar la respuesta inmune adaptativa. La IL-15 actúa como nexo entre ambos tipos de respuesta. La IL-15 activa las Células Dendríticas. También tiene un efecto directo sobre las células epiteliales.

La generación de Ac anti-TG se explicaría por la formación de neoepítopos generados a partir del complejo TG-gliadina, que actuaría como sistema hapteno-carrier (**figura 2.5**). Estos complejos presentados por las APC portadoras de DQ2, serían reconocidos por los T CD4<sup>+</sup> de la lámina propia, iniciando una respuesta Th1 o Th2. La respuesta Th1, a través del TNF- $\alpha$  principalmente, induciría la liberación de Metaloproteinasas (MMP-1 y MMP-3) incrementando la desestructuración de la mucosa por la rotura de fibras de colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos. La respuesta Th2 induciría la maduración y expansión de células B plasmáticas productoras de Ac anti-gliadina y TG.

<sup>16</sup> *Transaminación: Transferencia del acilo (COOH-) de un grupo gamma carboxi-amino de una Gln hacia un grupo epsilon amino de una Lys (u otra amina primaria), dando como resultado la formación de un enlace gamma-glutámico-epsilon-lisina. El sitio activo de la Transglutaminasa tiene tres residuos conservados (Cisteína, histidina y asparragina) que están presentes en el Factor XIII de coagulación.*

#### 2.9.4 Secuencia inmunogénica de la $\alpha$ -Gliadina.

En el año 2000 Arentz y colaboradores describen dos secuencias inmunodominantes reconocidas por linfocitos de mucosa tras la deaminación de la Gln por la TG (41). Ese mismo año Anderson encuentra la existencia de un péptido que contiene los dos epitopos encontrados por Arentz, que asociados a DQ2 son capaces de inducir la liberación de IFN- $\gamma$  en PBL provenientes de pacientes adultos (42). Las posiciones P4 y P6 del alelo HLA-DQ2 tiene mayor afinidad por residuos negativos, por lo que la deaminación de la Glu en Gln, incrementa la unión de los péptidos a dicha molécula (**figura 2.4**)

Un trabajo publicado por Vader y colaboradores, muestra que el número de antígenos reconocidos por células T obtenidas a partir de muestras de pacientes menores de 12 años parece ser mayor, encontrando respuesta de células T frente a nuevos epitopos de *gliadinas* y de *gluteninas* (99). Demuestra que la mayoría de niños tienen células reactivas contra péptidos de gluteninas, mientras la mitad reconoce los epitopos inmunodominantes en adultos. Algunos de los péptidos no necesitan deaminación para ser reconocidos, lo que implicaría que la respuesta podría iniciarse hacia péptidos nativos del gluten y se iría restringiendo con el tiempo hacia una especificidad dirigida frente a péptidos deaminados. En base a algoritmos matemáticos Koning y col sugieren que podrían existir por lo menos 50 péptidos activos en gluten (trigo) y hordeinas (cebada) (45).

Recientemente se ha identificado mayor número de péptidos de  $\alpha$ - y  $\gamma$ -gliadinas que asociados a DQ2 son capaces de activar linfocitos T de mucosa (100). Estos nuevos péptidos se encuentran agrupados por regiones ricas en prolinas. Por qué la gliadina y no las aveninas? El porcentaje de residuos de Pro presentes en las aveninas es menor que en las gliadinas. La especificidad de la tTG estaría determinada por la distancia entre prolinas y glutaminas (45).

#### 2.9.5 Péptido de 33aa capaz de inducir la enfermedad.

Shan y colaboradores sugieren la existencia de un péptido de 33aa<sup>17</sup>, como posible inductor de la respuesta inflamatoria. Este péptido tiene la peculiaridad de ser resistente a la digestión por varias proteasas pancreáticas, intestinales y gástricas (44). Los péptidos anteriormente descritos como inmunodominantes, están incluidos en este segmento de 33aa. Esta proteína está presente en los cereales tóxicos para los enfermos celíacos (trigo, cebada, centeno) y ausente en los cereales no tóxicos como la avena, el maíz y el arroz. Este péptido se une con alta afinidad a DQ2 y no requiere de procesamiento para ser presentado por la APC (**figura 2.4**) (101).

Sin embargo existen por lo menos 15 péptidos de gluten reconocidos por células T, muchos de los cuales no están presentes en este fragmento de 33aa (102).

<sup>17</sup>Secuencia de  $\alpha$ -gliadina (Acc Number: AJ133612): (5). Remarcado el péptido de 33aa obtenido de la digestión de una  $\alpha$ -gliadina.

MVRVPVPQLQ PQNPSQQQPQ EQVPLVQQQQ FPGQQQPFPP QQPYPQPQPF PSQQPYLQLQ **PFPPQQLPYP**  
**QPQLPYPQPQ LPYPQPQPF** PQQPYPQSQP QYSQPQQPIS QQQQQQQQQQ QQKQQQQQQQ QILQQILQQQ  
 LIIPCRDVLQ QHSIAYGSSQ VLQQSTYQLV QQLCCQQLWQ IPEQSRCQAI HNVVHAIILH QQQQQQQQQQ  
 QQPLSQVSFQ QPQQQYPSGQ GSFQPSQQNP QAQGSVQPQQ LPQFEEIRNL ALETLPAMCN VYIPPYCTIA

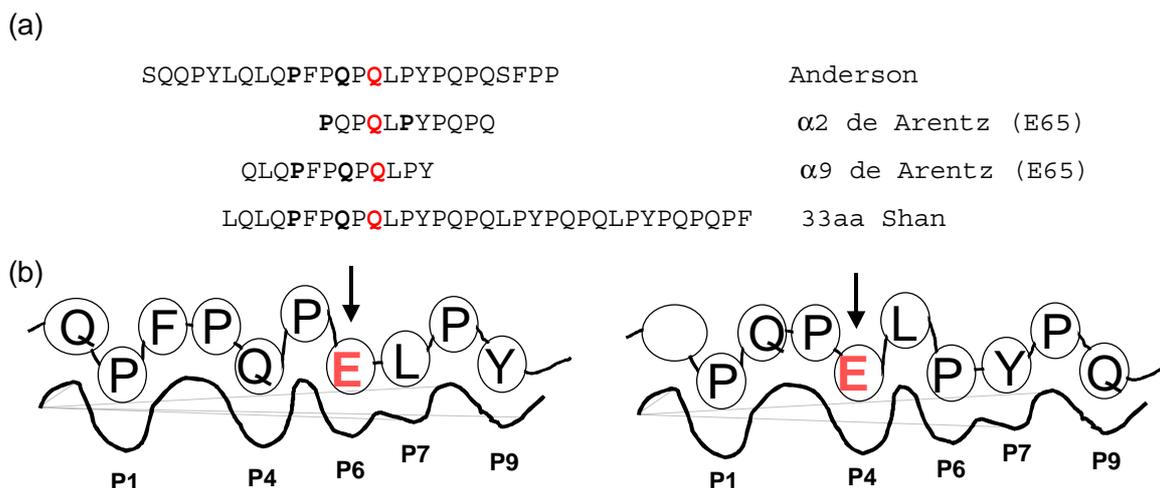


Figura 2.4: Esquema de la interacción entre los péptidos de gliadina, reconocidos por células T y HLA-DQ2. (a) Péptidos inmunodominantes de la  $\alpha$ -Gliadina. El péptido dominante encontrado por Anderson es el 57-73 (Q65E, que comprende los dos epítomos encontrados por Arentz ( $\alpha$ -2: 62-75, y  $\alpha$ -9: 57-68). El péptido de  $\alpha$ -Gliadina de 33aa descrito por Shan incluye a los otros péptidos (44). (b) Las posiciones P4 y P6 tienen preferencia por residuos negativos, por lo que la interacción de los péptidos con HLA-DQ2 aumenta tras la deaminación de la Gln (Q), presente en el péptido original, en Glu (E).

### 2.9.6 Modelo animal de la Enfermedad celíaca.

Existe un modelo animal con características semejantes a la enfermedad celíaca. Ratones transgénicos para un TCR $\alpha\beta$ , específico de un péptido de la lisozima de huevo (46-61), pueden ser inducidos a una patología similar a la observada en la celiaquía (40). Este modelo permite detectar una respuesta inmune específica a un antígeno, descartando el papel en la inmunomodulación de otras células reguladoras específicas de otros antígenos luminales. No descarta el papel de los TCR $\gamma\delta$  ni de los linfocitos B, ya que el transgénico está hecho en ratones RAG<sup>+/+</sup>.

La administración conjunta de lisozima de huevo y de indometacina<sup>18</sup> (inhibidor de COX-2) produce: proliferación de células de la cripta, incremento de células mononucleares de LP y aplanamiento de la vellosidad. La COX-2 interviene en la síntesis de PGE<sub>2</sub> (Prostaglandina-E<sub>2</sub>) a partir de ácido araquidónico. La PGE<sub>2</sub> tiene efectos inmunomoduladores: disminuye la expresión de HLA clase-II y del receptor de IL-12, incrementa la síntesis de IL-10 y disminuye la de TNF- $\alpha$  e IL-12. La alteración en la síntesis de metabolitos derivados del ácido araquidónico, pueden producir una alteración de la homeostasis inmunológica y llevar a una respuesta frente a antígenos no patogénicos, tolerados en condiciones normales.

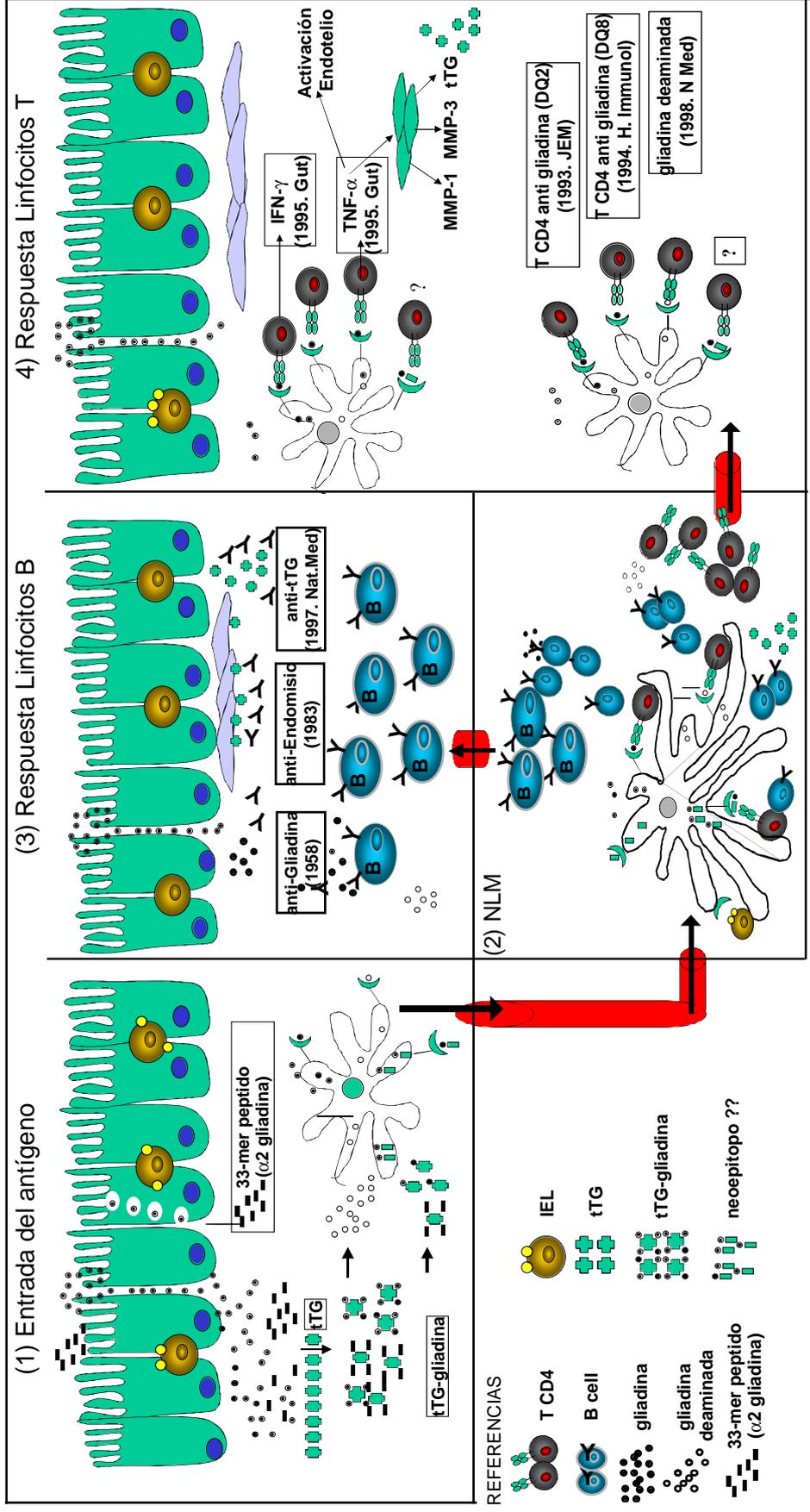
<sup>18</sup>La indometacina es un anti-inflamatorio no esteroideo. Tiene un efecto perjudicial en el tratamiento de la enfermedad de Crohn. Las CMLP (Células mononucleares de Lámina propia), fundamentalmente macrófagos, producen COX-2.

## 2.10 Resumen

La complejidad del sistema inmune en general y en particular el de mucosa está dado por el alto y diverso tipo de células leucocitarias que lo componen, en especial de linfocitos T. A esto se han de sumar distintos tipos celulares que componen el epitelio intestinal, un sistema dinámico de regeneración constante.

En la EC, péptidos de gliadina y otras proteínas, son deaminadas por la tTG2, se unen a DQ2 y activan células T en adultos. El requerimiento de la tTG no sería necesario para la activación de las células T en los estadios tempranos de la enfermedad ya que se han encontrado células T reactivas frente a péptidos de gluten no deaminados. El hecho de que un pequeño porcentaje de los portadores de HLA-DQ2 desarrollan la enfermedad se puede relacionar con la existencia de otros factores, implicados en el inicio de la EC. Péptidos no inmunodominantes, de la gliadina, podrían estar implicados en iniciar la respuesta innata (IL-15) actuando, como señal de peligro.

*Los IELs están incrementados en la EC. Su papel en la patogénesis de la enfermedad se desconoce. Este aumento no sería una consecuencia del proceso inflamatorio que se produce en la lámina propia. Cuál es el papel de los IELs en la EC?*



**Figura 2.5:** Modelo con los procesos más relevantes de la patogénesis de la EC.

(1) Captura del antígeno. La gliadina ingresa a través de las células epiteliales por un mecanismo de transporte transcelular (capturada y transportada por la célula epitelial o célula M) o paracelular (entre el espacio que separa las células epiteliales). El antígeno nativo o deaminado por la tTG extracelular es capturado por células presentadoras (DC, MO) presentes en la LP. (2) Inducción de la respuesta específica. La CD con el antígeno inicia la respuesta en el MLN. Se generan células B y T antígeno específicas que se dirigen a la mucosa. (3) Las células B productoras de IgG e IgA específicas de gliadina y de la tTG se dirigen a la LP. Los Ac anti-endomisio (tTG) podrían bloquear la migración de las células de la cripta hacia la vellosidad. Los Ac anti-tTG también pueden bloquear la activación del TGF- $\beta$  mediada por la enzima, impidiendo la maduración de las células epiteliales por falta de este factor de crecimiento. Los Linfocitos T CD4 que reconocen péptidos de gliadina en contexto de DQ2 o DQ8 producen principalmente IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . El TNF- $\alpha$  interviene en la activación del endotelio y en la liberación de Metaloproteasas (MMP-1 y MMP-3) que hidrolizan proteínas de la matriz, generando la desestructuración de la mucosa. El TNF- $\alpha$  aumenta la síntesis de tTG por las fibroblastos. También se generan linfocitos T que colaboran en la activación y diferenciación de células B.



### 3. Linfocitos Intraepiteliales

Los Linfocitos Intraepiteliales (IELs) son células T que se encuentran adheridas a la superficie basolateral de los enterocitos a lo largo de todo el epitelio intestinal. Forman una población separada dentro del sistema linfoide de la mucosa.

Los IELs son residentes del epitelio e, independientemente de si se seleccionan o no en el timo, sus requerimientos para el reconocimiento de ligando y la activación difieren de los principios clásicos dependientes de las APC de los órganos linfoides secundarios (103). Por sus características fenotípicas y su distribución tisular se cree que esta población es responsable de la defensa local del tejido frente a infecciones y tumores y de la regulación de la respuesta mediada por otras células.

#### 3.1 Antecedentes<sup>19</sup>

La primera referencia que se tiene de los IELs se remonta al año 1847 cuando Weber describe unas células pequeñas y redondas en el epitelio (103). Sobre 1970, comienzan los primeros trabajos descriptivos de estas células. Están ubicados en la parte basal del epitelio en la franja delimitada por el núcleo de la célula epitelial y la lámina basal (29). Las técnicas de microscopía electrónica permitieron establecer su disposición dentro del epitelio y la interacción de los IELs con las células epiteliales (104). Se observan linfocitos atravesando la membrana basal en ambas direcciones (epitelio-LP, LP epitelio) (**Figura 3.1**).

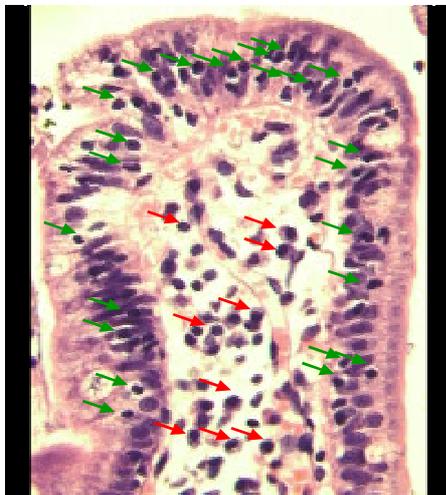
Por cada 100 enterocitos hay una media de entre 10 y 30 IELs (104). El incremento de esta población en la EC lo describe por primera vez Ferguson y col. en 1971 (29). Se encuentran hasta 80 IELs por cada 100 células epiteliales, superándose en algunos casos el 100% (IELs>Células Epiteliales). El número de IELs varía según la zona del epitelio, observándose más IELs en la zona luminal que en la cripta. Esta distribución diferencial no se observa en la mucosa normal.

La mayor densidad de IELs no es exclusiva de la EC. También se encuentran aumentados en la mucosa de enfermos con Dermatitis Herpetiforme y en algunos niños con Giardiasis. Los IELs también se incrementan en el rechazo de injerto contra huésped y en ciertas enteropatías tropicales y diarreas crónicas.

<sup>19</sup> Historia de los Linfocitos T. Los Linfocitos son descubiertos en el año 1774, por el inglés William Hewson en su trabajo sobre la descripción del sistema linfoide (*British journal of haematology* 2001, 112, 282-292). La historia de los linfocitos dentro de la inmunología se inicia con los primeros trabajos de James Murphy, becario en el año 1909 de Peyton Rous (*Sarcoma de Rous*). Su trabajo comprende estudios sobre el comportamiento de los linfocitos en el rechazo de injertos de tejido y tumores en embriones de gallina; sobre la relación entre la irradiación, la linfopenia y el rechazo de tumores así como el efecto de la radiación en la infección por tuberculosis. James Gowans fue quien en 1962 demostró que los linfocitos (*small lymphocytes*) iniciaban la respuesta inmune (106). Tras la depleción de los linfocitos a través del drenaje del conducto torácico, la respuesta primaria de anticuerpos frente a toxoide decaía, pero se recuperaba tras la transferencia de los linfocitos "pequeños" de una rata de la misma cepa. La respuesta secundaria no se afectaba tras el drenaje del conducto, demostrando que las células responsables estaban en el tejido linfoide. También mostró que la tolerancia hacia un injerto se revertía con la inyección de los linfocitos provenientes de un animal no tolerizado. Al cabo de 7-10 días aparecían células marcadas con H<sup>3</sup> infiltrando el tejido.

En cambio, en enfermedad de Crohn y en colitis ulcerosa, el número de IELs en biopsias de yeyuno se mantiene dentro de los niveles normales.

No existen diferencias entre el número de IELs en niños y en adultos. Los IELs son células memoria, que se cree que llegan al epitelio tras estimulaciones con antígenos provenientes de la dieta y/o de la sangre (105).



**Figura 3.1:** Vellosidad de una mucosa celíaca. Las flechas señalan a los IELs (verde) y a los LPL (rojo)

### 3.2 Características fenotípicas. Receptores y otras moléculas

#### 3.2.1 Tiempo de inmunohistoquímica: Antisueros, Ac monoclonales y fluorocromos.

Al comienzo los linfocitos se clasificaban en T (derivados del Timo) y B (derivados de la Bolsa de Fabricius). Se los diferenciaban en pequeños, medianos y grandes y de vida corta o vida larga. Sobre la década de los 70 se dudaba sobre el tipo de linfocitos que componían los IELs. En un primer momento se pensó que existían linfocitos de ambos linajes (T y B), ya que la timectomización no reducía totalmente el número de IELs. Luego se vería que tampoco eran B, sino linfocitos que no se seleccionan en timo (ver más abajo: pg, 51).

La posibilidad de conjugar *antisueros* específicos de linaje T con Fluoresceína<sup>20</sup>, permitió saber que la mayoría de IELs eran linfocitos T (104). Entre los años 1981 y 1983, con la aparición de los primeros *Ac monoclonales*, comienzan los análisis inmunofenotípicos de los IELs *in situ*, sobre secciones de tejido y mediante técnicas de inmunofluorescencia (32,107). Las células CD3<sup>+</sup> (UCHT1) aparecen entre las 11 y 19 semanas de gestación, tanto en el epitelio como en la LP (108).

En la mucosa del yeyuno, existe aproximadamente un 85 % de IELs CD8<sup>+</sup>. Tanto en controles como en EC los IELs CD8<sup>+</sup> (90 %, OKT8)) predominan sobre los CD4<sup>+</sup> (8 %) (31). En LPL esta proporción se invierte a favor de los CD4<sup>+</sup> (60% vs 40%).

<sup>20</sup> Las primeras técnicas de inmunofluorescencia comienzan en el año 1970 a partir de la posibilidad de conjugar anticuerpos con fluorocromos (109).

### 3.2.2 Dos subpoblaciones principales de IELs. Linfocitos T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ .

Sobre finales de los 80, tomó interés el estudio de la distribución de los dos TCR en el epitelio intestinal humano. Esto se debió a que previamente se había observado que en ratones y aves, los linfocitos TCR  $\gamma\delta$  eran los que predominaban en dicho tejido. En humanos la distribución es diferente.

Dentro de los IELs existen, al igual que en periferia, células con dos tipos de receptores<sup>21</sup>: IELs  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ . Los primeros estudios indicaban que un anticuerpo (WT31), que por entonces se pensaba que era específico de los TCR  $\alpha\beta$  (también podía reconocer ciertos TCR  $\gamma\delta$ ) marcaba la mayoría de los IELs (33). Más tarde se confirmó que entre un 70-90% de los IELs expresan el TCR  $\alpha\beta$  (110).

La presencia de IELs que expresan el heterodímero  $\gamma\delta$ <sup>22</sup> (35) es cercana al 10%, variando entre un 3-38 % (117). Hasta las 20 semanas de gestación, no se observan linfocitos  $\gamma\delta$  pero sí células CD3<sup>+</sup> (118). A diferencia de las  $\gamma\delta$  de periferia donde predominan los  $\gamma\delta$ 2, en el epitelio intestinal predomina el heterodímero  $\gamma\delta$ 1.

### 3.2.3 Correceptores<sup>23</sup>.

Los IELs se pueden clasificar según el correceptor asociado al TCR $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$  en: CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>, CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup>/CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> (DN) y CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> (DP) (**tabla 1**).

Los IELs humanos expresan principalmente el correceptor CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup> y el CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup> (**tabla 2**) (122,123). Dentro de los  $\gamma\delta$  los CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> (DN) comprenden más del 80% , mientras que la mayoría de los T  $\alpha\beta$  expresan el heterodímero CD8 $\alpha\beta$ . En ambas poblaciones existe en menor porcentaje el homodímero CD8 $\alpha\alpha$ . Los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (DP) son indetectables. No se encuentra en epitelio intestinal el receptor  $\gamma\delta$  asociado al CD4, a diferencia de los de sangre periférica (124).

La cadena  $\alpha$  del correceptor CD8 es la que interacciona con el dominio  $\alpha$ 3 de HLA - clase I y la que se asocia a la tirosin kinasa p56. Sin embargo es la cadena  $\beta$  la que confiere la propiedad de correceptor, incrementando la interacción con clase I. Si bien la interacción de ambos correceptores parece tener igual afinidad por HLA clase I, la cadena  $\beta$  incrementaría la valencia del heterodímero, aumentando la afinidad por tetrámeros de clase I. La asociación del correceptor al complejo TCR:MCH-péptido, estabilizaría la unión y/o amplificaría la señalización (125). El modelo conven-

<sup>21</sup>La existencia de un receptor en las células T comienza a vislumbrarse en el año 1982 con los primeros antisueros y AcMo clonotípicos capaces de inmunoprecipitar heterodímeros de 80-90 kDa. Estos heterodímeros estaban formados por dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$  de 40-45 kDa cada una). Los antisueros eran capaces de bloquear el reconocimiento específico de las células T y/o de inducir la proliferación de los linfocitos cuando se adherían a una superficie. El análisis de los péptidos precipitados de distintos clones T indicaban cierto polimorfismo. Estudio paralelo a los serológicos permitieron identificar los genes responsables de la síntesis de las cadenas  $\beta$  del TCR en ratones (111,112) y en humanos (113). Poco tiempo después se describe la cadena  $\alpha$  (114, 115). La especificidad dada por el TCR se demostró tras transfección de los genes (116). La **figura 3.2** muestra las principales moléculas implicadas en la señalización del TCR.

cional de interacción entre el TCR y el correceptor (CD4 o CD8) sugiere que este ocurre indirectamente a través del CD3 y las tirosin kinasas ZAP-70 (CD8) y Lck (CD3). Un modelo más reciente postula que durante la unión del TCR al complejo péptido-MHC, el correceptor asociado a este TCR, interacciona con otro complejo permitiendo la unión de un segundo TCR. De esta manera se genera una dimerización del TCR favorecida por el correceptor (126). Si bien la agregación artificial del TCR induce señalización, existen evidencias que indican que, al menos para CTL, un único complejo péptido-MHC es suficiente para hacerlo.

Correceptor	TCR $\alpha\beta$	TCR $\gamma\delta$		TCR $\alpha\beta$	TCR $\gamma\delta$
CD8 $\alpha\beta$	5 (12%)	-		70 (81%)	-
CD8 $\alpha\alpha$	25 (62%)	55 (92%)		10 (11%)	2 (14%)
DP (CD8 $\alpha\alpha$ /CD4 <sup>+</sup> )	5 (12%)	-		-	-
DN (CD8 $\gamma$ /CD4)	5 (12%)	5 (8%)		-	12 (86%)
CD4+	-	-		6 (7%)	-
TOTAL	40	60		86	14
	ratón	ratón		Humano	Humano

**Tabla 1:** Subpoblaciones de IELs en ratones y humanos.  
Referencias: Ratón:(127).Humanos: (122,123).

### 3.2.4 Moléculas de adhesión y circulación en el epitelio<sup>24</sup>.

Distintos tipos de moléculas de adhesión y sus co-ligandos median el tráfico de los linfocitos en la mucosa (**figura 3.3**). La expresión constitutiva o inducible de muchas de estas proteínas determinarán la ubicación de los IELs en el epitelio. Algunas de estas moléculas también tienen un papel importante en el reconocimiento y activación de los linfocitos.

Una característica común de los IELs es la expresión de la integrina  $\alpha_E\beta_7$ , ( $\alpha_E$ :CD103 (HML-1) (33). Esta integrina además es expresada por un 40% de los linfocitos de LP. Está formada por dos péptidos de 175 kDa ( $\alpha_E$ ) y 105 kDa ( $\beta_7$ ) que a través de una unión heterotípica con la E-caderina determina la ubicación de los IELs en el epitelio (129,130). Los ratones KO para CD103 tienen una disminución importante de IELs (131), mientras que los ratones deficientes en  $\beta_7$  carecen de linfocitos en PP, LP y epitelio (132).

El otro miembro de la subfamilia de las integrinas  $\beta_7$  es la  $\alpha_4\beta_7$  ( $\alpha_4$ :CD49d) (133). Esta integrina, cuyos coligandos son *MadCAM* (*Mucosal Adressin Cell Adhesion Molecule*), fibronectina y CD106 (*VCAM*, *Vascular Cell Adhesion Molecule*), está presente en un 30-50% de los IELs (134). Este porcentaje obtenido en tinciones sobre tejido se contrapone con los datos obtenidos en IELs aislados del tejido, en los que todos expresarían esta integrina (135).  $\alpha_4\beta_7$  interviene en la locali-

<sup>22</sup>La historia del TCR  $\gamma\delta$  nace poco después de la identificación del receptor  $\alpha\beta$ . A diferencia de este último (primero se identificó el péptido y luego el gen codificante), su identificación fue consecuencia del descubrimiento de un mRNA codificante para una nueva región variable, llamada más adelante, cadena gamma. La inmunoprecipitación de péptidos de CD3, llevó a identificar una población de linfocitos que carecían de la expresión de transcritos de las cadena alfa y beta (119).

zación de los linfocitos en las PP a través de MadCAM. Como MadCAM también se expresa en los capilares de la LP, los IELs ingresarían a la mucosa a través de la unión de MadCAM con las integrinas  $\alpha_4\beta_7$  y/o  $\alpha_4\beta_1$ . Estas dos integrinas  $\alpha_4$  pueden mediar el rodamiento de los linfocitos sin necesidad de la L-selectina (CD62L). La interacción (débil) entre  $\alpha_4\beta_7$  y VCAM en el endotelio ocurriría en condiciones de inflamación (136). Una vez en la LP, alguna quimiocina (IL-8) los llevaría hasta el epitelio. Su paso por la matriz extracelular estaría mediado por las integrinas  $\beta_1$  o por  $\alpha_4\beta_7$ . En el epitelio los IELs aumentarían la expresión de  $\alpha_E\beta_7$  (¿por TGF- $\beta$ ?) que retendría a los IELs cuando interactúan con E-caderina. Por tanto, las integrinas  $\alpha_E\beta_7$  y  $\alpha_4\beta_7$  cumplirían funciones diferentes en los IELs:  $\alpha_4\beta_7$  sería necesaria para el pasaje de los IELs desde los capilares hacia la LP (y de los linfocitos a las PP) y la  $\alpha_E\beta_7$  para su ubicación en el epitelio. En resumen, para que los IELs se ubiquen en el epitelio, es necesario, primero, que los IELs hayan sido previamente activados y segundo, es importante el aumento de  $\alpha_4\beta_7$  para la migración (137). El uso de animales transgénicos específicos de péptidos de OVA asociados a clase I permitió determinar que los linfocitos T vírgenes específicos de OVA no se ubicaban en el epitelio. Sólo se veían en la mucosa tras estimulaciones con antígeno. La localización en la mucosa iba acompañada de un aumento de  $\alpha_4\beta_7$  y  $\alpha^E\beta_7$  en los IELs y en NLM de las células T Tg.

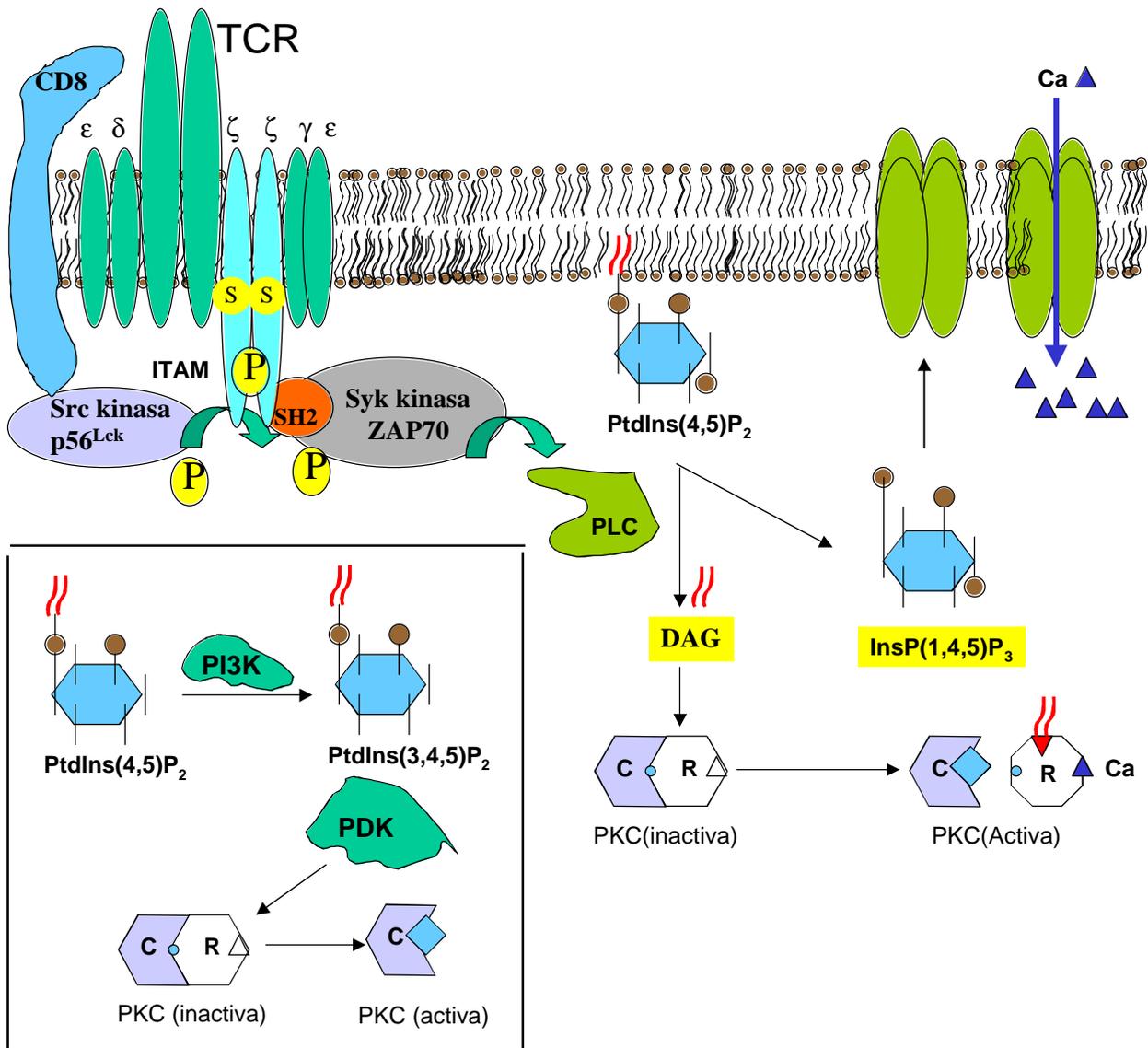
Otra integrina expresada en los IELs es la  $\alpha_4\beta_1$  (CD49d/CD29 o VLA-4) que mediaría, junto con  $\alpha_L\beta_2$  (CD11a/CD18 o LFA-1), la interacción entre estos IELs y las células de mesénquima (membrana basal) (138). Los IELs aislados de tejido mantienen la expresión de esta integrina (135).  $\alpha_4\beta_1$  tiene más afinidad por VCAM que  $\alpha_4\beta_7$ . VCAM se expresa poco en el endotelio, pero sí en las APC de la LP, sugiriendo un papel más relevante en la interacción entre los LPL y las APC, que en la migración de los IELs (139). Tanto la  $\alpha_4\beta_1$  como la  $\alpha_4\beta_7$  se expresan en menor intensidad en IELs que en LPL (139).

El heterodímero  $\alpha_L\beta_2$ , ligando de ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3 también se expresa en los IELs al igual que CD44 (familia de proteoglicanos) que media la adhesión con las HEV a través del ácido hialurónico (140). La expresión de  $\alpha_L\beta_2$  en IELs aislados, es menor que en PBL (135). La ausencia de ICAM-1 en enterocitos, tanto en celíacos como en pacientes con Crohn, indicarían que la coestimulación via LFA-1 no sería funcional en los IELs. El CD50 (ICAM-3), otro ligando de LFA-1, se expresa constitutivamente en IELs mientras que CD54 (ICAM-1) sólo se expresa tras activación, aunque si se observa en el endotelio y en macrófagos de la mucosa.

Otra molécula que está presente en todos los linfocitos es CD2. Es una proteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas cuyo ligando, CD58 (LFA-3) se expresa en enterocitos (95). CD2 puede aumentar la proliferación y síntesis de citocinas de los IELs (141,122). Además de

<sup>23</sup>Los correceptores son proteínas que incrementan la sensibilidad del TCR hacia el antígeno, uniéndose al co-ligando y participando en señales de activación (p.ej: CD4 se une a MHC-clase II y el CD8 a clase I). El CD8 $\alpha\beta$  interactúa con el dominio  $\alpha_3$  del MHC clase I (128).

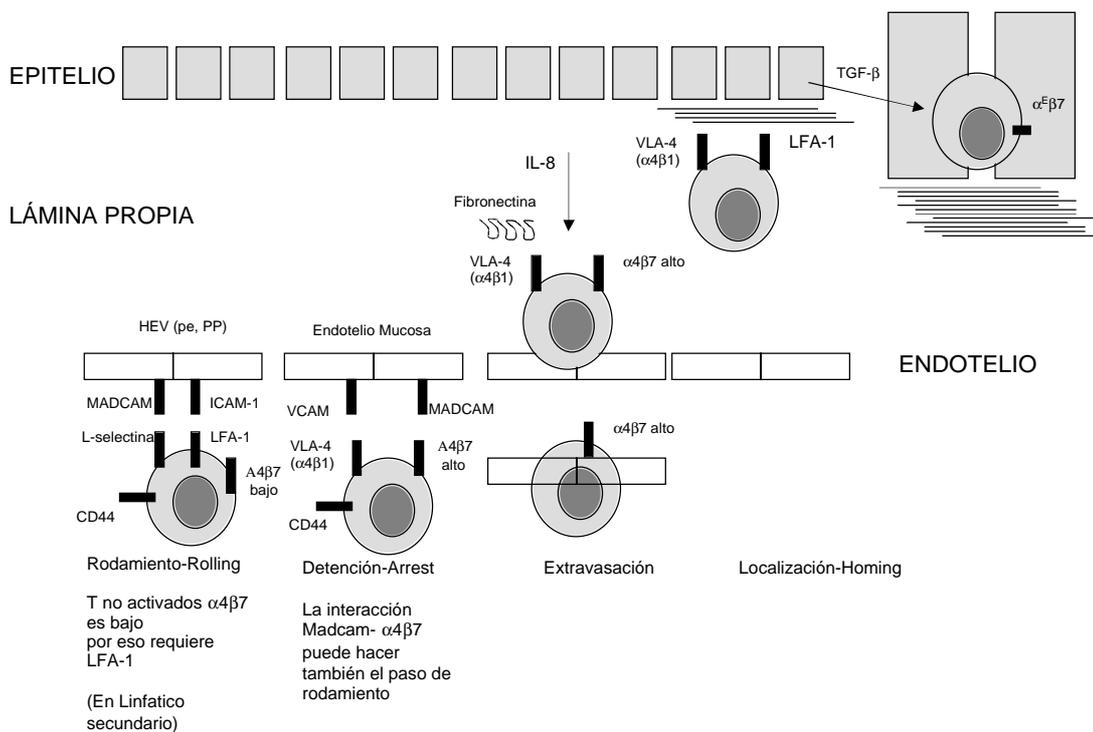
*Sinapsis inmunológica.* Para el reconocimiento antigénico por parte de un linfocito T, se deben localizar en la membrana de esta célula y en la APC una serie de proteínas que se organizan de manera que favorecen el reconocimiento y la activación celular. La reorganización involucra tanto a los correceptores CD4 y CD8, como a moléculas co-estimuladores (CD28, CTLA-4, CD2) y de adhesión (LFA-1). A la interacción que surge de dicha reorganización molecular, se la denomina sinapsis inmunológica.



**Figura 3.2:** Señalización a través del TCR. La interacción del TCR con su ligando inicia la señalización intracelular a través de Tyrosin kinasas (Src-p56<sup>Lck</sup>) que fosforilan tirosinas presentes en los dominios ITAM de las cadenas  $\zeta$  del complejo CD3. Esta fosforilación permite la unión de los dominios SH2 (Src Homology 2) presentes en ZAP-70 (Zyk Kinasa). Esta inicia la fosforilación de una serie de proteínas entre las que se encuentra la PLC (Phospholipase C). La activación de la PLC induce la hidrólisis de fosfatidil inositol (4,5) P<sub>2</sub> (Phosphatidyl Inositol biphosphate), generando DAG (Diacilglicerol) e inositol polifosfatos (InsP(1,4,5)P<sub>3</sub>). El DAG activa una serie de serin kinasas (PKC y PKD) mientras que el InsP(1,4,5)P<sub>3</sub> regula los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular. Uno de los blancos de la PKC es el factor de transcripción (NF)- $\kappa$ B. La PKD está altamente expresada en las células T activadas. La PKD sólo se activa a través de la señalización del TCR y no por citoquinas, moléculas coestimuladoras o quimiocinas. Las serin kinasas también son activadas por Serin/treonin kinasas dependientes de PtdIns (3,4,5)P<sub>3</sub> (PDK). El PtdIns (3,4,5)P<sub>3</sub> se genera por la fosforilación del PtdIns (4,5)P<sub>2</sub> catalizado por la PI3K (Phosphatidil Inositol 3 Kinase) (120,121).

participar en la adhesión celular, transmite señales intracitoplasmáticas que sinergizan con las producidas a través del TCR.

Además del CD49d antes mencionado, otras integrinas que dimerizan con la cadena  $\beta_1$  (CD29) son: CD49f (VLA- $\alpha_6$ ) también presente en los IELs (140), que no expresan la integrina  $\alpha_2$  (CD49b), mientras que  $\alpha_3$  (CD49c) y  $\alpha_5$  (CD49e) lo hacen con baja intensidad (138). Estas integrinas intervienen en la adhesión con proteínas de la matriz extracelular (colágeno, fibronectina, laminina).



**Figura 3.3:** Ubicación de los IELs en el epitelio. La  $\alpha_4\beta_7$  expresada en linfocitos T activados, participa en el rodamiento y en la adhesión firme al endotelio de la mucosa, a diferencia de lo que sucede con las HEV (vénulas de endotelio alto) de los órganos linfoides secundarios, donde es fundamental la interacción de la L-selectina con su ligando. La extravasación también requiere de  $\alpha_4\beta_7$ . La unión de los IELs con las células del mesénquima se produce a través de la interacción  $\alpha_4\beta_1$ -VCAM y de LFA-1-ICAM. La asociación entre los IELs y las células epiteliales está mediada por la integrina  $\alpha_E$ (CD103) $\beta_7$  y la E-Cadherina. CCL25 (TECK) interviendría en la quimiotaxis de los IELs CCR9<sup>+</sup>.

<sup>24</sup>Las Moléculas de adhesión son proteínas que median la adhesión entre células o de la célula a la matriz extracelular. Dentro de estas se encuentran integrinas (CD103), selectinas (CD62L), miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (CD2) y el CD44 y proteínas relacionadas. Las Selectinas son glicoproteínas integrales de membrana con dominios N-terminal de tipo lectina que unen azúcares complejos del tipo sLe<sup>x</sup>. Las Inmunoglobulinas tienen una estructura proteica con al menos un dominio de tipo inmunoglobulina, semejantes al de los Ac's. Las Integrinas están constituidas por dos cadenas proteicas diferentes.

### 3.2.5 Moléculas co-estimuladoras<sup>25</sup>.

CD28 es un homodímero de la superfamilia de las Ig que se expresa en un pequeño número de IELs: 15 % de los IELs CD3+ CD45RO<sup>+</sup> (97,142). Su función es la de transmitir la señal coestimuladora al linfocito T tras la unión a su ligando CD80 (B7). Esta señal coestimuladora regula la activación de la célula T: incrementa su proliferación, su capacidad citotóxica, la expresión de CD25, la producción de citoquinas regulando la expresión de sus genes y/o la estabilización de su mRNA (143). En periferia está presente en los linfocitos CD4<sup>+</sup> y en un 50% de los CD8<sup>+</sup>. El CD28 posee motivos YxxM en su región citoplasmática que tras su fosforilación se une e induce la activación de la PI-3K, aunque no está claro la importancia de dicha enzima en la estimulación de los linfocitos T (**figura 3.2**) (144).

Los datos sobre la expresión de CD154 (CD40L), a través del cual los Linfocitos T co-estimulan a los linfocitos B, son escasos, si bien estaría ausente en la mayoría de los IELs.

### 3.2.6 Moléculas de activación.

Los IELs no expresan CD25 (cadena  $\alpha$  del RIL-2), ni HLA-DR (31,145). La ausencia de CD25 se confirma en IELs totales de tejido control (135). La expresión de CD69 no está muy clara, parece ser baja, aunque un poco más alta que los PBL en reposo (135). El marcador de proliferación celular, la proteína nuclear Ki67, sólo se observa en un 12% de los IELs en enfermos celíacos (145). Otros autores no encuentran Ki67 (135).

### 3.2.7 Receptores NK.

NKG2D es un receptor activador NK de expresión constitutiva en linfocitos CD8<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$ , en TCR  $\gamma\delta$  y NK, y los IELs no son la excepción (146)]. Se ha demostrado su capacidad coestimuladora en distintos subtipos de células T (**figura 3.4**).

CD94, que puede asociarse a NKG2A (receptor inhibidor) o NKG2C (receptor activador) se expresa en un 27% de IELs, incrementándose hasta un 75% en EC (147). Este aumento no se asocia a la forma inhibitoria CD94/NKG2A. La expresión de CD94 ocurre mayoritariamente en IELs TCR  $\alpha\beta$ .

La **tabla 2** muestra distintos receptores NK expresados en células T. Además de NKG2D y CD94, otros receptores NK están presentes en la membrana celular de los IELs. El más representado es CD161 (NKPR1A), en un 58 % de la población de IELs (147). Este receptor de la familia de las lectinas, cuyo ligando se desconoce, es capaz de generar señales coestimuladoras. NKp46 es otro receptor activador, pero de la superfamilia de las Inmunoglobulinas (KIR) que se expresa en un 7% de IELs. Los receptores KIR2D/S no superan el 3%.

<sup>25</sup>Moléculas co-estimuladoras, son proteínas presentes en la célula presentadora, capaces de dar la señal co-estimuladora necesaria para la proliferación y/o producción de citocinas por parte de los linfocitos T. El CD80 (B7.1) y el CD86 (B7.2) son ejemplos de estas proteínas que actúan sobre el CD28 y el CTLA-4 respectivamente.

	NOMBRE	Ligando	En células	Señalización	Motivos	Anticuerpo	Efecto Ac
<b>Ig-SF (Superfamilia de las Inmunoglobulinas) INHIBIDORES</b>							
p58.1	KIR2DL1	HLA-CW4		SHP1/SHP2 (fosfatasa)	ITIM	EB6 HP-3E4-cd158a	
p58.2	KIR2DL2	HLA-C				GL183	
cd158b	KIR2DL3	HLA-C				DX27 CD158-b CH-L	
p70	KIR3DL1	HLA-BW4	IEL (<3%)			DX9 Z27	
p140	KIR3DL2	HLA-A?	IEL (<3%)		ITIM	5.133 Q66	
p49	KIR2DL4	HLA-G ?					
p40	LAIR	¿?					
By55			IEL y NK		ITIM		

<b>Ig-SF (Superfamilia de las Inmunoglobulinas) ACTIVADORES</b>							
p50.1 cd158a	KIR2DS1	HLA-CW4		DAP12 ZAP70/Syk	ITAM	EB6 HP-3E4-cd158a	
NKp46		¿¿	IEL (7%)	CD3γ IP3/DAG FcεR1γ Fyn/Lck	ITAM	BAB 281	Coestimula
NKp44		¿?	T γδ/ NK	DAP12/ZAP70	ITAM		
	KIR3DS						
NKp30		¿?	NK	CD3γ FcεR1γ			Bloqueo parcialcitotox
P50.3	KIR2DS3	HLA-C				PAX169	
PAX						PAX180 PAX250	

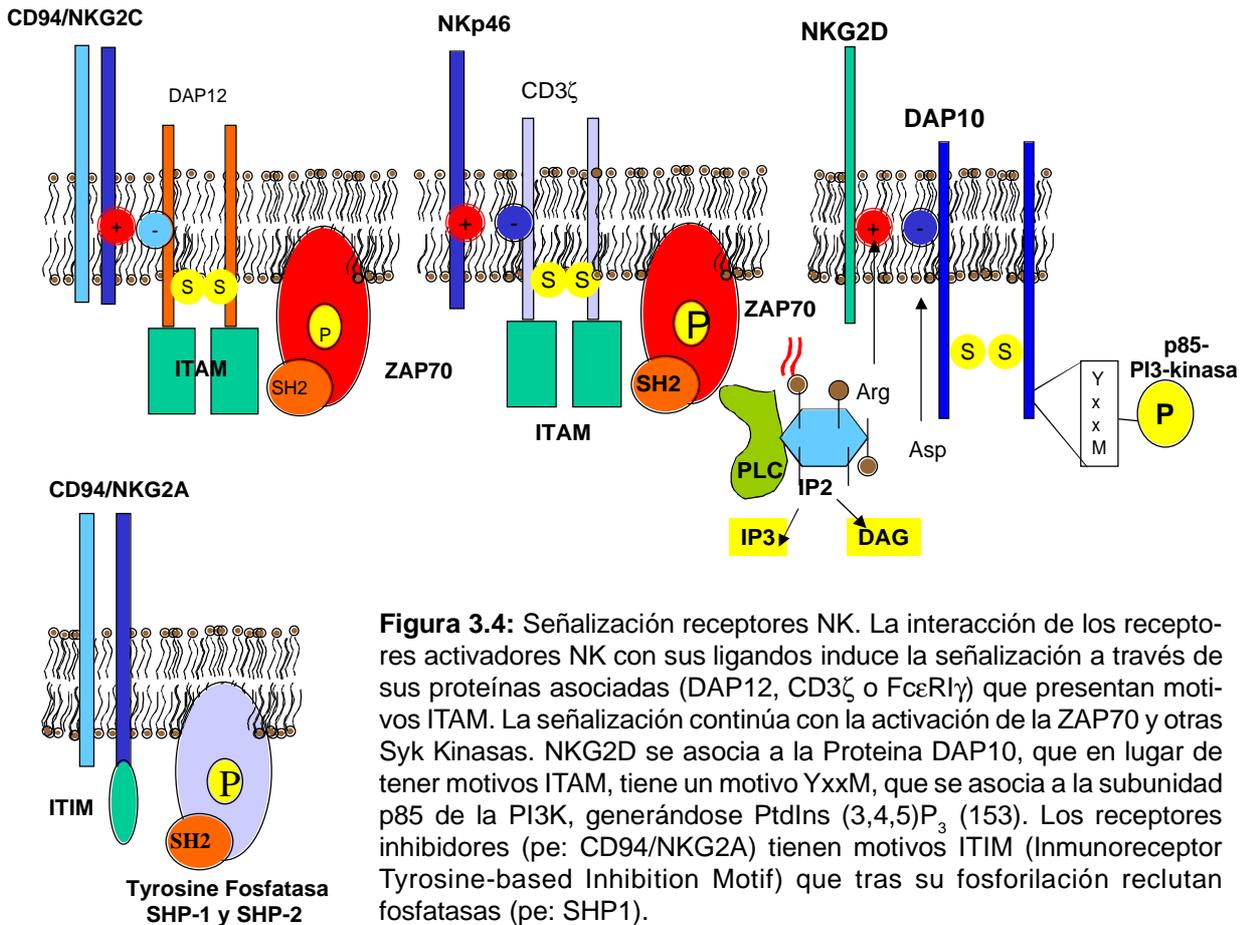
	NOMBRE	Ligando	En células	Señalización	Motivos	Anticuerpo	Efecto Ac
<b>Lectin Like Receptors INHIBIDORES</b>							
	CD94/ NKG2A	HLA-E QA1 <sup>h</sup> (ratón)	NK cell CTL IELs	SHP1/SHP2 (fosfatasa)	ITIM	Kp43 (CD94)	Inhibe citot Lisis redirigida

<b>Lectin Like Receptors ACTIVADORES</b>							
	CD94/ NKG2C	HLA-E	IELs	DAP12 ZAP70/Syk	ITAM	No hay anticuerpo específico	Activ Citotox Lisis redirigida
	CD161	¿¿	IELs (58%)			191B8	Coestimula
	NKG2D	MICA/B	NK, CTL, IELs	DAP10 P85-PI3-kinasa	YINM	1D11	Bloqueo citotox

<b>Lectin Like Receptors NKR INHIBIDOR/ACTIVADOR ¿?</b>							
	CD94/Kp39	¿?					

	NOMBRE	Ligando	En células	Señalización	Motivos	Anticuerpo	Efecto Ac
<b>Ig-Like Transcripts (ILT) INHIBIDORES</b>							
	ILT2 (CD85¿?)	HLA-G HLA-A HLA-B	NK cell T cell B cell MO				
	ILT4		MO				

**Tabla 2:** Receptores NK expresados en células T. Los principales receptores presentes en IELs son NKG2D (100%), CD161 (58%), CD94 (27%), NKp46 (7%). Los KIR2D/S no superan el 3%.



**Figura 3.4:** Señalización receptores NK. La interacción de los receptores activadores NK con sus ligandos induce la señalización a través de sus proteínas asociadas (DAP12, CD3 $\zeta$  o Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ ) que presentan motivos ITAM. La señalización continúa con la activación de la ZAP70 y otras Syk Kinasas. NKG2D se asocia a la Proteína DAP10, que en lugar de tener motivos ITAM, tiene un motivo YxxM, que se asocia a la subunidad p85 de la PI3K, generándose PtdIns (3,4,5)P<sub>3</sub> (153). Los receptores inhibidores (pe: CD94/NKG2A) tienen motivos ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif) que tras su fosforilación reclutan fosfatasas (pe: SHP1).

### 3.2.8 Otras moléculas

Según Halstensen el porcentaje de IELs TCR  $\alpha\beta$  CD45RO es cercano al 60%, mientras que el de los TCR  $\gamma\delta$  ronda el 80% (148,149). Este porcentaje se invierte en celíacos donde los  $\gamma\delta$  alcanzarían el 60% y los TCR  $\alpha\beta$  CD45RO+ subirían a un 75%. Estos datos son sobre cortes de tejido. Un 80 % de los IELS TCR  $\alpha\beta$  expresa CD5, que no se observa en los T  $\gamma\delta$  (122). La **figura 3.5** resume algunas de las moléculas involucradas en la interacción entre células T y la APC.

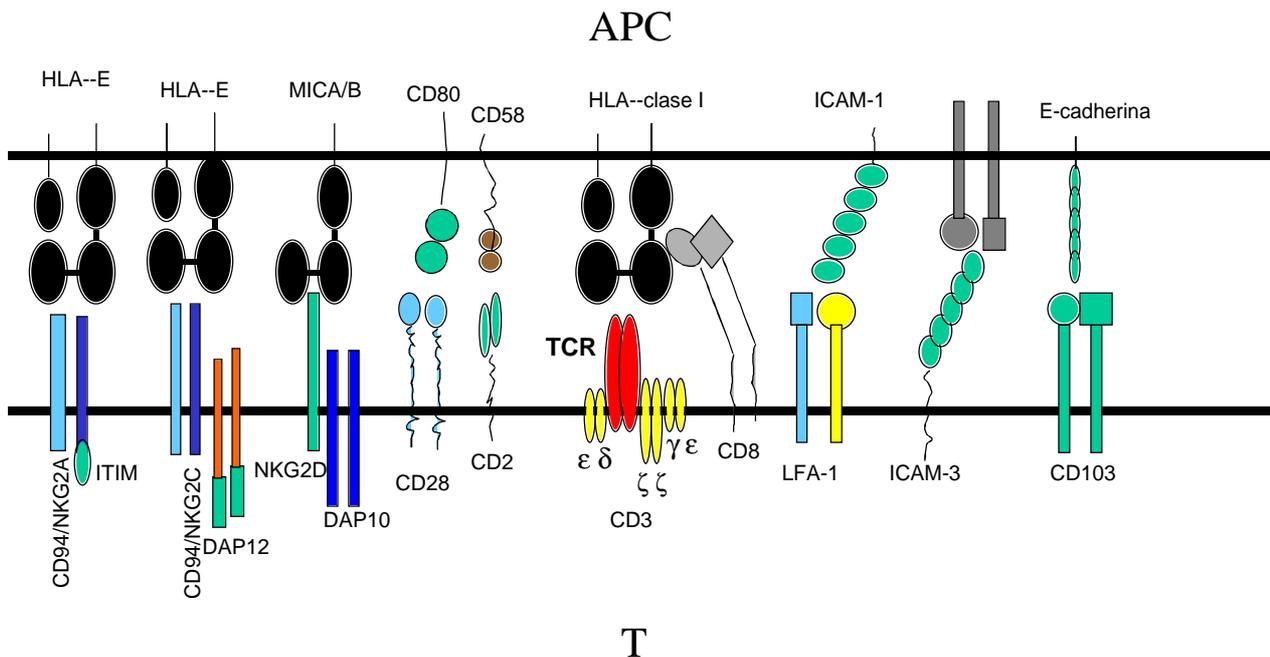
### 3.2.9 Receptores de quimiocinas.

Una característica fenotípica de los IELs (y linfocitos de mucosa intestinal en general) es la expresión de CCR9, cuyo ligando la CCL25 (TECK- thymus expressed chemokine) que se expresa en el epitelio del intestino delgado. La expresión restringida del receptor y su ligando jugarían un papel relevante en la localización de los IELs en la mucosa (150). También se expresan constitutivamente los receptores CXCR3, CCR5 y CCR2 (151). CXCR4 se expresaría a bajos niveles como consecuencia de la internalización que se induce tras su interacción con el SDF-1 liberado por las células epiteliales del intestino (152).

CD	Nombre	Ligando	PM (Kd)	IELs	Función
CD1a	OKT6				
CD1b	WM25				
CD1c	L161				
CD2	OKT11	CD58 (LFA-3)			Adhesión via CD58
CD3	OKT3				Transducción señal
CD4	Leu3	HLA-II	Gp59		Molécula accesoria (coreceptor)
CD5		CD72	Gp67		Proliferación
CD6			Gp100		Activación
CD7			Gp40		Activación
CD8a	Leu2	HLA-I	Gp32		Molécula accesoria (coreceptor)
CD8β	2ST8-5H7		Gp32		Molécula accesoria (coreceptor)
CD11a	LFA-1		Gp180		Adhesión
CD16	Leu-11a	FC Ig's	Gp48		Receptor Ig's baja afinidad
CD18	β2		Gp95		Adhesión (CD11a/CD18)
CD25	TAC	IL-2	Gp55		Receptor IL-2 (Sub α)
CD26	Peptidasa IV		Gp110		
CD27		CD70	Gp55		familia TNFR
CD28	158-2E10	CD80	Gp44		señal co-estimuladora
CD29	β1		Gp130		Adhesión (CD29/CD49)
CD30			Gp105		Activación ( familia TNFR)
CD43			Gp95		Desconocido?
CD44	H-CAM		Gp 90		Adhesión a HEV
CD45			Gp200		CD45RA/CD45RB
CD46			Gp60		
CD47			Gp47		
CD49d	VLA α4		Gp210		Adhesión Fibronectina y VCAM
CD50	ICAM-3	LFA-1	Gp120		Transducción señal?
CD54	ICAM-1	CD11/CD18	Gp90		Adhesión
CD56	NKH-1		Gp180		Adhesión homofílica
CD62L	L-selectina		Gp 76		Adhesión HEV
CD94	Kp43				Transducción de señal
CD99			Gp32		Adhesión, señalización?
CD100			Gp150		Activación, coestimulación
CD101			Gp140		Señalización?
CD103	HML-1(αE)		Gp150		Adhesión
CD106	VCAM		Gp100		Adhesión
CD109			Gp170		Activación/proliferación?
CD122	IL-2 Rβ		Gp75		Receptor IL-2
CD127	IL-7 R		Gp75		Receptor IL-7
CD143			Gp170		
CD146					
CD147			Gp35		
CD148			Gp200		Tirosine fosfatasa
CD152	CTLA-4	CD80/CD86	Gp33		Regulador Negativo activación T
CD153		CD30	Gp40		Coestimulo, efectora, (TNFR)
CD154	CD40L	CD40	Gp33		Molécula coestimuladora (TNFR)
CD178	FASL				Apoptosis (TNFR)

**Tabla 3:** Algunos de los CD<sup>26</sup> expresados en células T.

<sup>26</sup>Los clusters de diferenciación (CD) son grupos de anticuerpos monoclonales que identifican una misma proteína presentes en la superficie celular de distintos tipos celulares. A esta molécula se la denomina CD seguido de un número. Hasta el día de hoy existen más de 100 CD que pueden expresarse en células de linaje T (**tabla 3**).



**Figura 3.5:** Principales moléculas implicadas en la interacción y señalización de Linfocitos T.

### 3.3 Producción de citoquinas por IELs

Aunque *in situ* algunas citoquinas no puedan detectarse, los IELs en su conjunto podrían potencialmente secretar todo el espectro posible de estos mediadores solubles. Es indiscutible la expresión de IFN- $\gamma$ , producida tanto por IELs, como por LPL específicos o no de gliadina. Otras dos citoquinas, IL-4 e IL-2<sup>27</sup> parecen ser minoritarias o al menos difíciles de detectar. La citoquina más controvertida, es la IL-10, cuya expresión *in situ* parece ser muy baja.

Los IELs de mucosa duodenal no patológica, expresan mRNA para IFN-g, TNF-a, IL-1b, IL-2 e IL-8 (154). Tras activación *in vitro* pueden producir IL-10, TNF-b y TGF-b 1. Estos autores no encuentran IL-4 ni IL-5. La expresión escasa de IL-4 observada en la misma mucosa normal se confirmaría con la producción muy baja por parte de los IELs y LPL aislados *in vitro* (155). Según estos autores, son los LPL los únicos capaces de producirla *in vitro* tras estimulación con PHA y/o CD3.

En 1998 Carol y colaboradores determinaron mediante ELISPOT el número de células aisladas de mucosa normal que espontáneamente producían IFN-g e IL-4. El 1% de los IELs CD4<sup>+</sup> como los LPL son los responsables de la liberación de IL-4 (156). Hanson describe por histoquímica células IL-4 positivas en LP y en el epitelio de algunas biopsias (93). Por PCR en tiempo real también se detectan niveles bajos de IL-4 en IELs y LLP (80). La expresión del factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) parece no ser exclusiva de EC (92). No se ha visto que sea expresado por IELs ni por LPL. Los IELs CD8<sup>+</sup> producen TNF-a tras estimulación *in vitro* (157).

Recientemente, un estudio de expresión de citocinas por PCR en Tiempo Real encuentra un aumento en la expresión de IFN- $\gamma$  y de IL-10 por parte de los IELs de pacientes enfermos, tratados y desafiados con gluten respecto a los controles. Estos mismos autores encuentran que los niveles de IL-4 son bajos y no hay diferencias para TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IL-2 (80). La expresión de IL-10 se contradice con los estudios en biopsias de Nilsen (86), pero avalarían los encontrados por Beckett y Lahatt (87).

La expresión de citocinas en la mucosa intestinal revela que los estudios en IELs CD8<sup>+</sup> TCR  $\alpha\beta$  son escasos en controles (141,154,155) y celíacos (80). No hay hasta el momento datos sobre la expresión y producción de citocinas por clones IELs  $\gamma\delta$  y  $\alpha\beta$ .

<sup>27</sup>IL-2. Descubierta en el año 1976. Otro nombre: T cell growth factor (TCGF). Proteína de la familia de las Hematopoyetinas (IL-4, IL-5). Cromosoma 4 (4q26-q27) Homodímero: 133 aa. Glicoproteína globular. Únicamente la producen células T activadas (principalmente Th1). El 80 % de los linfocitos CD4 de sangre periférica produce IL-2 y sólo un 30% de los CD8<sup>+</sup> estimulados con PMA/Ionomicina. Receptores: IL-2R $\alpha$  (CD25), IL-2R $\beta$  e IL-2R $\gamma$ . Actúa sobre células T y NK exclusivamente. Induce proliferación de linfocitos T activados por antígeno, inducción actividad LAK, aumento actividad NK. Aumenta la producción de IFN- $\gamma$  y de TNF- $\alpha$ . Promueve la actividad citotóxica activando la producción de perforina y serin esterases presentes en los gránulos citotóxicos. Aumenta directa o indirectamente la expresión de casi todas las citoquinas. Promueve y evita la apoptosis. La apoptosis por falta de estímulos de supervivencia es a través de la activación de la caspasa-9. La IL-2 promueve la expresión de BCL-2 (que interfiere con la apoptosis). La expresión de CTLA-4 inducida por IL-2 es una señal negativa para la expresión del gen de la IL-2. Los glucocorticoides también ejercen un efecto negativo en la producción de IL-2. La falta de IL-2 en ratones KO produce una disminución del 90% en los linfocitos CD8<sup>+</sup> antígeno específicos. El desarrollo de los linfocitos es normal al nacimiento pero durante el desarrollo postnatal hay hiperplasia de los órganos linfoides 2rios por acumulación de linfocitos con fenotipo activado. También generan anemias por respuesta autoinmunitaria y generación de anticuerpos, incluidos anti-DNA. Los animales que sobreviven presentan colitis ulcerosa que se previene sólo en condiciones libres de patógenos. Esto pasa en ratones deficientes de CTLA-4 lo que indica que tanto la deficiencia de IL-2 como la falta de regulación negativa de su expresión por ausencia de CTLA-4 produce una desregulación de su activación. Contrario a lo que se esperaba, la falta de IL-2 produce una sobreactivación y no una inmunodeficiencia. La autoinmunidad inducida en los ratones deficientes de IL-2, podría deberse a la falta de regulación de la apoptosis mediada por CD95. La IL-2 induce un aumento de FAS y FASL, vitales en la eliminación de células autoreactivas. La respuesta inmune frente a infecciones es menor, pero detectable. La disminución más importante ocurre en los linfocitos CD8<sup>+</sup> antígeno específicos. La presencia de IL-4 o IL-7 no compensan la ausencia de IL-2. La sobreexpresión de IL-2 no produce alteraciones notables como enfermedades autoinmunes, leucemias o linfomas. El receptor gamma de la IL-2 está ubicado en el cromosoma X y su mutación genera la inmunodeficiencia severa combinada asociada al cromosoma X. (XSCID). Esta enfermedad presenta una disminución de Linfocitos T y NK, así como una escasa función de los linfocitos B, quizá debida a una falta de colaboración Th. La estimulación a través del CD28 (segunda señal) aumenta la expresión de IL-2 a través de la señalización de NFkB y la estabilización del mRNA del IL-2 (158).

### 3.4 Cuál es la función de los IELs<sup>28</sup>?

A partir de los trabajos de James Gowans sobre la década del 60 hasta el día de hoy se ha ido avanzando sobre el papel de los linfocitos en la respuesta inmune adquirida. Dentro de los linfocitos T se pueden reconocer dos poblaciones bien diferenciadas por la función que desempeñan a lo largo de la respuesta inmunitaria: los linfocitos colaboradores (Th) y los citotóxicos (Tc). Esta separación general, ha ido dando lugar a subpoblaciones particulares, diferenciadas por moléculas de membrana, tipo de receptores, patrón de citoquinas (Th1/Tc1, Th2/Tc2), ubicación específica dentro de los tejidos, por su papel en la memoria central o efectora, o por su función en la regulación de la respuesta. La presencia de distintos receptores de células T, muchas veces agrupados por el uso específico de cadenas variables (NKT-V $\alpha$ 24<sup>29</sup> y hValpha7.2-Jalpha33<sup>30</sup>) (159), también diferencia células con una función particular dentro del sistema inmune. La función de algunas de estas células (Células Regulatoras, Th3, Tr1, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) han sido descritas en el apartado del sistema inmune de mucosa.

El papel de los IELs es desconocida. A priori, la diversidad fenotípica de esta población hace suponer que cumplirían más de una función. Originariamente se les ha asociado una función supresora y de vigilancia inmunológica frente a células infectadas y/o tumorales (103). Actualmente existen evidencias de que algunos subtipos de IELs participarían además en la homeostasis y en la reparación del epitelio a partir de la secreción de factores de crecimiento (KGF- $\beta$ ). El estudio del *receptor*, su *especificidad* y el tipo de *citoquinas* que producen en un contexto determinado, pueden ayudar a inferir cuál es su función.

#### 3.4.1 Oligoclonalidad del repertorio del TCR.

Uno de los primeros trabajos sobre clonalidad en IELs lo realizó el grupo de Blumberg sobre una línea de linfocitos T expandidos *in vitro* a partir de una mucosa normal. El estudio de cadenas TCRVA y TCRVB por PCR y posterior secuenciación, concluye que la expansión es oligoclonal (161). Dos trabajos posteriores confirmarían esta oligoclonalidad, donde se demuestra que la utilización de ciertas cadenas es predominante (TCRVB1, 2, 3, 5 y 6) y el análisis de una de ellas (TCRVB6) es poco variable (162-164). El repertorio de genes variables V $\beta$  es amplio, pero dichos segmentos corresponden a reordenamientos oligoclonales.

<sup>28</sup>Una de las primeras teorías sobre la presencia de los IELs en el epitelio otorgaba a los antígenos del lumen intestinal la función de atracción y estimulación de los mismos, teoría descartada por los ensayos en animales libres de antígenos intestinales. Sobre la década de los 50 se especulaba con la posibilidad de que interviniesen en el transporte de nutrientes a otras células, hasta que representaban el último estadio de circulación, luego de pasar por el conducto torácico y la sangre. En un principio también se suponía que el tejido intestinal cumplía la función de órgano linfopoyético, donde se diferenciaban células B. Otras teorías decían que eran células K (ni B ni T) o mastocitos, por la presencia en algunos IELs de histamina (104).

El análisis de la cadena  $\beta$  del TCR de los IELs aislados tanto de intestino delgado como de colon, indica que los mismos clones dominantes se encuentran en secciones separadas del intestino (165). Es decir que la oligoclonalidad no ocurre dentro de una zona delimitada del tejido. La amplia distribución de ciertos clones indicaría que los IELs sufren una expansión clonal en respuesta a un limitado número de antígenos. Se desconoce si están dirigidos contra pocos antígenos (conservados) bacterianos o de la dieta o si reconocen antígenos endógenos expresados en caso de daño o infección. La diferencia antigénica entre el lumen del intestino grueso y del delgado sugiere que posiblemente los IELs estén reconociendo antígenos epiteliales más que de la misma flora bacteriana o de la dieta.

Otra posibilidad es que sean de vida media corta y que múltiples clones estén respondiendo temporalmente a distintos antígenos. La oligoclonalidad también puede significar que exista un número limitado de linfocitos capaces de colonizar el epitelio.

### 3.4.2 Especificidad antigénica. IELs TCR $\alpha\beta$ .

En 1991, se describió una población TCR  $\alpha\beta$  aislada de yeyuno capaz de reconocer un miembro de la familia de CD1<sup>37</sup> (CD1c) (161). Si bien los enterocitos no expresan CD1c, sí sintetizan la molécula no clásica de clase I CD1d (166), aunque hasta el momento no se han encontrado células T que reconozcan esta molécula no clásica de clase I. Ciertas células tendrían capacidad citotóxica frente a células de carcinoma de colon (167).

La expresión constitutiva en el epitelio de HLA clase-II (DR y DP) podría ser relevante sobre las pocas células CD4<sup>+</sup> que infiltran el epitelio. Ya que no expresan ICAM-1, ni moléculas coestimuladoras (CD80, CD86), difícilmente funcionen como células profesionales procesadoras de antígeno. La expresión de CD58 por estas células, podría incrementar a través del CD2 la señalización del TCR.

Los enterocitos, en cambio, participarían en alguno de los mecanismos de inducción de tolerancia. Anteriormente se ha mencionado la inducción de delección de células T específicas de OVA en ratones que expresan esta proteína en el epitelio intestinal (62). En humanos la especificidad antigénica de los IELs TCR  $\alpha\beta$  se desconoce, aunque muchos IELs “convencionales”, seguramente reconozcan péptidos asociados a moléculas clásicas de MHC clase I. Otros IEL $\alpha\beta$  “no convencionales” podrían estar reconociendo ligandos epiteliales no polimórficos (168).

<sup>29</sup>Las células NKT son linfocitos con un TCR único (V $\alpha$ 24) que reconocen glicolípidos asociados a CD1d. Estas poblaciones tiene una ubicación restringida, prencipalmente en el hígado, y se encuentran tanto en ratones como en humanos. Tendrían un papel importante tanto en la inmunidad innata como en la regulación de algunos procesos autoinmunes como la Deabetes y la EAE (Encephalitis Autoimmune Experimental).

### 3.4.3 Variabilidad y Especificidad de los IELs TCR $\gamma\delta$ .

En contraste con los linfocitos  $\gamma\delta$  de periferia, donde prevalecen los  $\gamma2\delta2$  (169), los  $V\delta1$  son la población principal de los IELs  $\gamma\delta$  (170), si bien otras familias TCR  $V\delta$  existen asociadas al epitelio intestinal (171).

Muchos estudios han intentado definir la especificidad y funcionalidad de los linfocitos T  $\gamma2\delta2$  de sangre periférica. El reconocimiento de antígenos bacterianos como PPD o Proteínas de Estrés Térmico (HSP) de Micobacterias (172) está claramente documentado para estas poblaciones T  $\gamma\delta$ .

Los Linfocitos T  $\gamma2\delta2$  también reconocen ligandos no peptídicos (*TUBag4*, un compuesto que contienen en 5' una timidina trifosforilada) (173), un buen número de fosfoantígenos no peptídicos, como *isopentil-pirofosfatos* y derivados del *prenyl-pirofosfato* (174,175) y *alkilamina* (176). Metabolitos de la síntesis del *mevalonato* se han definido como antígenos tumorales dianas de esta población de células T (177). Los intermediarios de dicha síntesis, actuarían como señal de peligro inductores de la respuesta inmune. El reconocimiento de estos antígenos parece no estar asociado a ningún elemento de restricción (119).

Algunas células T  $\gamma2\delta1$ , también de sangre periférica, reconocen la molécula no polimórfica tipo clase I, CD1c (178). Estas células lisan, proliferan y producen IFN- $\gamma$  en respuesta a CD1c.

La existencia de un ligando epitelial para las células T  $\gamma1\delta1$  aisladas de colon fue propuesto por Meurer y col.(179) y recientemente, otra molécula no clásica y poco polimórfica, como MICA/B<sup>32</sup>, se ha sugerido como ligando de una subpoblación de linfocitos T  $\gamma1\delta1$  (180,181). La expresión de MIC en tumores de colon y en epitelio intestinal sometido a estrés (tratamiento térmico) sugieren que dichos IELs pueden estar controlando la aparición de células transformadas. En ratones, linfocitos  $\gamma\delta$  presentes en la piel, con morfología dendrítica (DETC, Dendritic Epithelial T Cell), son capaces de controlar el crecimiento de keratinocitos que tras la exposición a carcinógenos incrementan la expresión de Rae1. Este análogo de MIC en ratón, induciría el reconocimiento y la lisis de las células transformadas a través de NKG2D (182).

Muchas de las características funcionales de los IELs son conocidas a partir de estudios realizados en ratones.

<sup>30</sup>MR1 (MHC-Related protein 1) es una molécula monomórfica clase IB, codificada en el cromosoma 1, y cuya principal función sería la de seleccionar y/o expandir a las células MAIT (Mucosa Associated Invariant T cells) que se encuentran en la lámina propia de la mucosa intestinal, otro tipo de células con un TCR específico (160). Su expresión estaría restringida a las células B (159).

### 3.5 IELs en ratón. Origen, subtipos y función

Los IELs no aparecen en ratón hasta la tercera semana de vida, cuando comienzan a ubicarse en el epitelio hasta alcanzar el máximo número a la sexta o séptima semana (104). El número de IELs TCR  $\alpha\beta$  depende de la presencia de antígenos en la dieta, según demuestran estudios comparativos hechos en ratones crecidos en condiciones libres de patógenos (Germ Free-GF) (185,186). Por el contrario, la flora intestinal no afecta el número de IELs TCR  $\gamma\delta$ .

#### 3.5.1 Origen de los IELs.

En ratón existen los mismos subtipos de IELs que en humanos. Las variaciones se encuentran en la proporción relativa de estas subpoblaciones (**tabla 1**). El ejemplo más claro lo constituye la mayor proporción de linfocitos T  $\gamma\delta$  respecto a los  $\alpha\beta$ . Estos superan el 50% de los IELs, de los cuales la mayoría expresan el correceptor CD8 $\alpha\alpha$  (127). *IELs TCR $\alpha\beta$  CD8 $\alpha\alpha$ +*. Entre los subtipos de Linfocitos TCR $\alpha\beta$ , los CD8 $\alpha\alpha$  (CD4+ o CD4-), son los únicos que se encuentran exclusivamente en el epitelio. La mayoría de estos linfocitos son de origen tímico. Ratones knockout para  $\beta_2m^{-/-}$  carecen de esta población, aunque si se seleccionan en ratones carentes de MHC-clase I (**figura 3.6**). Ratones deficientes de TAP, tienen muy pocos IELs con el fenotipo CD8 $\alpha\alpha$ +. Como CD1, Qa1 y TL son independientes de TAP (es decir están presentes en TAP $^{-/-}$ ), la selección estaría asociada a MHC clase Ib, dependiente de TAP. Efectivamente, la selección de estos linfocitos está asociada a Qa-2 (un MHC clase1b), como lo demuestran dos hechos: el alto número de IELs CD8 $\alpha\alpha$  en ratones transgénicos que hiperexpresan Qa2 y la ausencia en knockout Qa2 $^{-/-}$ . Se desconoce que elemento independiente de TAP se encarga de la selección de los pocos IELs CD8 $\alpha\alpha$  que aparecen en los ratones TAP $^{-/-}$ . Podría ser el mismo Qa2, que en ratones TAP $^{-/-}$ , al carecer de péptidos asociados, sería menos eficiente (127). Unos pocos IELs TCR $\alpha\beta$  CD8 $\alpha\alpha$  se seleccionarían extratímicamente. Ratones timectomizados RAG-2 $^{-/-}$  reconstituyen esta población (y además  $\gamma\delta$  CD8 $\alpha\alpha$ +) cuando se les inyecta con células de Médula ósea de donantes atímicos (187). *IELs  $\gamma\delta$  CD8 $\alpha\alpha$ +*. También son característicos del epitelio los IELs TCR  $\gamma\delta$  CD8 $\alpha\alpha$ +. Esta población, a diferencia de la anterior, es normal en ratones  $\beta_2m^{-/-}$  y

<sup>31</sup>Los antígenos CD1 son moléculas no polimórficas presentadoras de antígeno, codificadas fuera del MHC y ubicadas en un cromosoma diferente (cromosoma 1q22-23). Se las denomina moléculas "Tipo MHC-clase 1b". Al igual que sucede con las moléculas clásicas de clase I y II, pueden restringir a linfocitos T la respuesta frente a antígenos foráneos. Sin embargo, a diferencia de las moléculas codificadas por el HLA, se ha demostrado que presentan lípidos y glicolípidos. Su estructura exónica es muy similar a los genes de clase I, con tres exones ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ ) que codifican tres dominios extracelulares diferentes, que se asocian con  $\beta_2m$ . Según su homología de secuencia las moléculas CD1 se clasifican en dos grupos, el grupo 1 incluye a las moléculas CD1a, b y c, y el grupo 2 al CD1d y a sus homólogos.

también están presentes en knockout para MHC-clase I y clase II. No se seleccionarían en el timo. Cuáles son las evidencias? Ratones *atímicos* tienen linfocitos T  $\gamma\delta$  que se distribuyen en el intestino, principalmente en el epitelio. La transferencia de linfocitos de médula ósea de ratones *nude* transgénicos para el gen RAG-GFP, permitió determinar sitios de diferenciación extratímica (51). La transferencia de estas células en ratones *nude* o *timectomizados* al nacimiento indican que los NLM son los sitios principales de diferenciación.

Ratones *nude* tienen entre 2-5 veces menos IELs  $\gamma\delta$   $CD8\alpha\alpha+$  que los eutímicos (137).

IELs  $CD4+CD8\alpha\alpha+$ . Este tercer subtipo, se seleccionaría por MHC clase II y la expresión de  $CD8\alpha\alpha+$  ocurriría en la mucosa.

Hayday hace una clasificación en IELs *Tipo a* y *Tipo b* (103). Los IELs *Tipo a* serían en su mayoría  $CD8\alpha\beta+ TCR\alpha\beta$ , semejantes a los que presentan una circulación sistémica: ausentes en ratones carentes de MHC clase I, se seleccionan en el timo y serían activados en las Placas de Peyer, o en las zonas extrafoliculares del intestino, desde donde irían a los linfáticos mesentéricos para pasar de los linfáticos eferentes hacia al conducto torácico y de ahí a la sangre. Luego volverían a la LP del intestino.

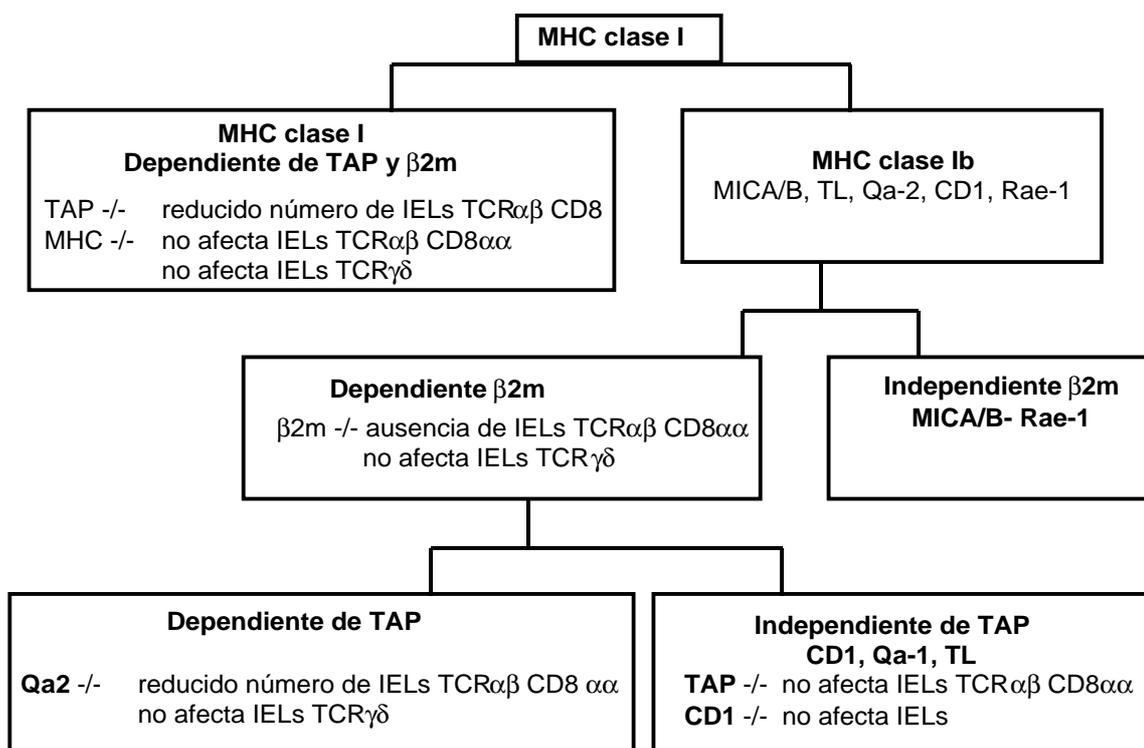
Los IELs  $TCR\alpha\beta CD8\alpha\alpha+$  y  $TCR\gamma\delta CD8\alpha\alpha+$  anteriormente mencionados entran dentro de los de *Tipo b*. Se generan en un número más reducido en ratones *atímicos*.

En resumen, la linfopoyesis extratímica es un mecanismo minoritario en la diferenciación T que ocurre principalmente en los NLM y en condiciones de timopoyesis defectiva (51).

### 3.5.2 Diferencias funcionales entre *Tipo a* y *Tipo b*.

El desarrollo de los linfocitos *Tipo b* en ratones carentes de moléculas polimórficas de MHC, sugiere un reconocimiento más restringido de estas poblaciones. Las evidencias son (103): 1) No han sido detectados via linfáticos ni en el conducto torácico (53), 2) su desarrollo no sería dependiente de antígenos bacterianos o de la dieta, 3) no hay evidencia de memoria inmunológica, 4) es lógico que sean estimulados por las mismas células epiteliales, 5) reconocerían estructuras menos polimórficas, probablemente propias e inducidas en caso de infección o transformación, 6) ratones transgénicos para un TCR son seleccionados positivamente (y no negativamente) por la expresión constitutiva de su antígeno en periferia (188).

<sup>32</sup>*MICA y MICB son moléculas polimórficas codificadas dentro del MHC con poca homología con las moléculas de HLA-clase I. No presentan péptidos, ni se asocia a  $\beta 2m$ . Su expresión está restringida a células epiteliales intestinales y su región promotora tiene elementos de respuesta a estrés térmico, similares a los encontrados en los genes de *hsp70*. El ligando de MIC es NKG2D. ULBP (UL16-binding protein) también es una molécula estructuralmente semejante a MICA/B. Tienen la particularidad de que se une a la proteína UL16 de citomegalovirus, lo que interfiere en el reconocimiento de ULBP por NKG2D (183). RAE1 (Retinoic Acid Early inducible 1) es una molécula de MHC clase Ib con homología a MIC, que se expresa en ratón. Al igual que MIC y ULBP, tampoco requiere de  $\beta 2m$  para su expresión. T10/T22 son moléculas de clase IB expresadas en ratón y que son reconocidas por algunas poblaciones de células T $\gamma\delta$  (184).*



**Figura 3.6:** Moléculas clásicas de MHC-clase I y no clásicas MHC clase Ib. El esquema indica el requerimiento de  $\beta 2m$  y TAP para la expresión en membrana de dichas moléculas. La carencia de algunas de dichas moléculas pueden interferir en la selección o supervivencia de distintas poblaciones de IELs. Basado en (127).

Los antígenos TL (thymus leukemia) son moléculas no clásicas de MHC clase I dependientes de  $\beta 2m$  que se expresan abundantemente en el epitelio de la mucosa intestinal de ratones. No presentan péptidos y su unión con el homodímero  $CD8\alpha\alpha$  es independiente de la especificidad del TCR (189). La interacción de los IELs  $CD8\alpha\alpha$  con su ligando TL, induce una baja proliferación y respuesta citotóxica, mientras que incrementa la síntesis de citoquinas, lo que sugiere que la modulación a través del homodímero  $CD8\alpha\alpha$ , *protegería* del daño de las células epiteliales (190). Esta población tendría funciones *reguladoras*, ya que se ha visto que IELs  $TCR\alpha\beta CD8\alpha\alpha$  son capaces de controlar el desarrollo de la colitis inducida por transferencia de células  $CD4+CD45RB^{hi}$ , a través de un mecanismo dependiente de IL-10 (191).

En el intestino, algunos IELs, principalmente  $\gamma\delta$ , a partir de la secreción de KGF- $\beta$  estarían ayudando a la proliferación de las células epiteliales (1929). Esto se ha observado en un modelo de inducción de colitis por Dextran sulfato de Sodio (DSS), en donde ratones carentes de células  $\gamma\delta$  son incapaces de reparar la mucosa cuando se suspende la administración de DSS. También se ha visto que células T  $\gamma\delta$  presentes en la piel de ciertos ratones, reconocen keratinocitos estresados o dañados, e intervienen en la *reparación* del tejido a través de la producción de factores de crecimiento como KGF- $\beta$  (193).

Si bien no se ha descrito que IELs  $\gamma\delta$  de la mucosa intestinal participen en la regulación del infiltrado producido en casos de *inflamación*, si se ha determinado que en un modelo de dermatitis, linfocitos T  $\gamma\delta$  controlan la inflamación cutánea inhibiendo la migración de las células T  $\alpha\beta$  (194).

### 3.5.3 Oligoclonalidad de los IELs en ratón. Seis datos concluyentes.

El análisis de las cadenas  $\beta$  del TCR en IELs  $CD8\alpha\beta^+$  ha demostrado que también en ratón el repertorio es *oligoclonal*, en contraste con los linfocitos T de periferia. Segundo, estos estudios también confirman que existen clonotipos compartidos entre IELs y LLP  $CD8^+$  en un mismo ratón (53). Tercero, los blastos del conducto torácico comparten idénticos clonotipos TCR  $\beta$  con los IELs  $CD8\alpha\beta$ . Cuarto, los mismos clonotipos se hayan distribuidos a lo largo de diferentes niveles del intestino delgado. Quinto, los repertorios son diferentes entre ratones de una misma cepa. Sexto, los IELs  $CD8\alpha\alpha$  también son oligoclonales, pero tienen clonotipos diferentes a los IELs  $CD8\alpha\beta$ , lo que avala el hecho de que sean poblaciones de distinta ontogenia (137).

## 3.6 IELs y enfermedad celíaca

Como ya se ha mencionado la patología está asociada a un aumento de IELs en la mucosa. Este incremento sugiere que podrían estar activamente involucrados en el proceso de desestructuración característico de la mucosa celíaca.

Se ha comentado anteriormente el papel que la IL-15 tiene en la inmunidad innata y su posible función en la inducción de la enfermedad. La IL-15 tiene un efecto directo en la modulación de ciertos receptores como NKG2D (97) y CD94 (147) presentes en los IELs. Los IELs  $CD94^+$  aumentan en la EC, mientras que la expresión de IL-15 y MIC, también ocurren en la mucosa de estos pacientes (168,195). Recientemente se ha visto que los IELs aislados de biopsias celíacas son capaces de mediar la lisis via NKG2D independientemente del TCR y sin necesidad de la preestimulación con IL-15 (195). La expresión de NKG2D, según estos autores se encuentra incrementada en los IELs aislados de pacientes celíacos, y la lisis mediada por este receptor ocurre en IELs o CTL previamente activados, es decir que la simple exposición de las células a IL-15 no alcanza para inducir la lisis. El aumento en la expresión de MIC, en los enterocitos de pacientes celíacos indicaría un reconocimiento directo de los IELs hacia los enterocitos que expresan MIC, generándose o bien la lisis de las células epiteliales, o las señales coestimuladoras necesarias (NKG2D-MIC) para la síntesis de citoquinas que intervienen en el desarrollo de la respuesta en la mucosa celíaca (168). Estos autores son precabidos con respecto al rol directo de NKG2D/MIC, ya que la lisis de células epiteliales es inhibida en pequeña cantidad tras el agregado de AcMo anti-NKG2D, sugiriendo la presencia de otros ligandos epiteliales capaces de activar al TCR. El NKG2D tendría una mayor relevancia en la celiaquía refractaria, donde ciertas células  $CD3^-$  (NK) reconocen y lisan células  $MICA^+$ . Algunos IELs (principalmente  $\gamma\delta$ ) participarían en la regulación del infiltrado ya que el aumento de estas células se correlacionaría inversamente con los síntomas de la enfermedad (103).

### **3.7 Resumen**

Los IELs comprenden una población de células T mayoritariamente  $CD8^+ \alpha\beta^+$  y en menor proporción 0células  $\gamma\delta$ , ambas con una gran diversidad fenotípica. La oligoclonalidad de sus receptores y la presencia de poblaciones específicas del tejido sugieren un reconocimiento restringido de ligandos. Si bien se desconocen que tipo de antígenos inducen la activación de estas células, estarían implicadas en distintas funciones como el reconocimiento de células tumorales, de células infectadas, en el mantenimiento de la homeostasis del sistema (crecimiento de epitelio, T  $\gamma\delta$ , KGF) y en un posible rol en la regulación de la respuesta inmune suprimiendo la respuesta frente a antígenos de la dieta. Las enteropatías inflamatorias serían una consecuencia de la disfunción de la actividad supresora. Se desconoce de que manera están implicados en el desarrollo de la EC, si bien se sugiere un rol activo en la patogénesis de la enfermedad.

### 3.8 Historia IELs en Humanos

- **1847.** Weber describe unas células redondeadas entre el epitelio del intestino delgado
- **1967.** Observación de intraepiteliales por microscopía electrónica.  
*Electron and light microscopic observations on relationships between lymphocytes and intestinal epithelium. Meader, RD. 1967.(196)*
- **1971.** Cuantificación de IELs en el Yeyuno humano. Aumento en enfermos celíacos.  
*Quantification of intraepithelial lymphocytes in human jejunum. Gut. 1971. (29)*
- **1972.** Infiltrado de linfocitos en el diagnóstico de enteropatías por sensibilidad a gluten.  
*Lymphocytic infiltration of epithelium in diagnosis of gluten-sensitive enteropathy Fry L. Br Med J. 1972: 3:371 .*
- **1981.** Caracterización de IELs en la mucosa humana por técnicas de inmunofluorescencia sobre cortes de tejido. *Immunohistological characterisation of intraepithelial lymphocytes of the human gastrointestinal tract (107)*
- **1983.** Descripción de subpoblaciones en epitelio intestinal  
*Lymphocyte subpopulations in the human small intestine. The findings in normal mucosa and in the mucosa of patients with adult coeliac disease Selvy ( Clin Exp Immunol)(31)*  
*Immunohistologic and immunoelectron microscopic characterization of the mucosal lymphocytes of human small intestine by the use of monoclonal antibodies. Cerf-Bensussan. JI. 130:2615*
- **1987.** Descripción de un marcador celular característico de IELs.  
*A monoclonal antibody (HML-1) defining a novel membrane molecule present on human intestinal lymphocytes Cerf-Bensussan (Eur j immunol)(33)*
- **1988.** Describe la presencia de gamma deltas en epitelio intestinal de ratón  
*Expression of the gamma-delta T-cell receptor on intestinal CD8+ intraepithelial lymphocytes. Goodman.Nature. (197)*
- **1989.** Expresión de  $\gamma\delta$  en epitelio intestinal humano.  
*Expression of disulfide-linked and non-disulfide-linked forms of the T cell receptor gamma/delta heterodimer in human intestinal intraepithelial lymphocytes. Spencer.Eur J. Immunol [(35).*
- **1989.** Incremento de  $\gamma\delta$  en celíacos.  
*Intraepithelial T cells of the TcR gamma/delta+ CD8- and V delta 1/J delta 1+ phenotypes are increased in coeliac disease. Halstensen. (Scand. J. Immunol) (36).*
- **1991.** El incremento de T  $\gamma\delta$  no es específico de la EC  
*Gamma/delta T cells and the diagnosis of coeliac disease. Spencer. (J Clin Investig) (198).*
- **1991.** Reconocimiento de CD1 por IELs  
*Oligoclonal expansion and CD1 recognition by human intestinal intraepithelial lymphocytes. Balk (Science) (161).*

- **1991.** Case report. Incremento de gamma deltas en celíacos latentes.  
*Increase in gamma/delta T cell receptor bearing lymphocytes in normal small bowel mucosa in latent coeliac disease.* Maki. (Gut) (199).
- **1992.** oligoclonalidad TCR V $\beta$  en IELs (en mucosa normal)  
Oligoclonality of human intestinal intraepithelial T cells. Van Kerckhove (JEM) (162).
- **1992.** Estudio funcional de Linfocitos  $\gamma\delta$ .  
*Phenotypical and functional characterization of small intestinal TcR gamma delta + T cells in coeliac disease.* Rust ( Scand. J . Immunol) (200).
- **1993.** Descripción más completa de IELs en epitelio intestinal humano celíaco.  
*Activated T lymphocytes in the celiac lesion: non-proliferative activation (CD25) of CD4+ alpha/beta cells in the lamina propria but proliferation (Ki-67) of alpha/beta and gamma/delta cells in the epithelium.* Haltsen. (Eur J Immunol) (145).
- **1993.** Repertorio TCR en clones  $\gamma\delta$  en celíacos.  
*T cell receptor heterogeneity in gamma delta T cell clones from intestinal biopsies of patients with celiac disease.* DeLiberio. (Eur. J Immunol) (170).
- **1994.** La E-caderina media la interacción de los IELs a través de  $\alpha_E\beta_7$   
*Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E- cadherin and the alpha E beta 7 integrin Cepek.*(Nature) (129).
- **1995** Oligoclonalidad de Linfocitos en la mucosa celíaca  
*T cell receptor repertoire in the peripheral blood and intestinal mucosa of coeliac patients.* Lahat. (Clin Exp. Immunol) (201)
- **2000.** Incremento de IELs CD94+ en EC  
*Selective expansion of intraepithelial lymphocytes expressing the HLA-E-specific natural killer receptor CD94 in celiac disease.* Jabri, B. (Gastroenterology) (147).
- **2001.** IL-15 aumenta de la expresión de NKG2D en IELs  
*NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment.* Roberts. (J Immunology) (97).
- **2002.** Incremento de IELs productores de IL-10 en celíacos  
*Paradoxical coexpression of proinflammatory and down-regulatory cytokines in intestinal T cells in childhood celiac disease* (80)
- **2004.** NKG2D está incrementado en los IELs provenientes de enfermos celíacos  
*Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease.* Meresse. (Immunity) (195)
- **2004.** Incremento de MIC en el epitelio intestinal de pacientes celíacos  
*A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease.* Hùe (Immunity) (168)

*Objetivos*

---



## OBJETIVO GENERAL

Caracterización fenotípica y funcional de las células T intraepiteliales del intestino delgado. Análisis de las expansiones linfocitarias específicas de la enfermedad celiaca.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislamiento y caracterización de un clon CD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> de una biopsia intestinal sin patología.
2. Comparación de las poblaciones clonales CD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> de pacientes celíacos y no celíacos
3. Análisis fenotípico y funcional de una población CD8<sup>+</sup> V $\alpha$ 2.3 de Lámina Propia, correspondiente a una población expandida entre los linfocitos T de una biopsia Celíaca.
4. Estudio de las células  $\gamma\delta$  intraepiteliales en la enfermedad celíaca. Análisis funcional. Subpoblaciones. Caracterización fenotípica y búsqueda de ligandos.







## A-Técnicas de Biología Celular.

### 1. *Obtención de Biopsias*

Las biopsias fueron obtenidas de pacientes pediátricos atendidos en la Unidad de Gastroenterología (Hospital Prof. Pedro Garrahan, Buenos Aires, Argentina) tras el consentimiento de los padres. La muestra se obtuvo a nivel del ángulo de Treitz en el duodeno. Para su realización se empleó una cápsula de Crosby-Kugler, de doble boca. Esta cápsula permite obtener dos muestra simultáneas. Una de ellas es incluida en parafina para su análisis morfológico y posterior diagnóstico. La biopsia restante se colocó en medio de cultivo utilizado para transportar la biopsia (IMDM + 10% SA y 10 x antiibiótico).

### 2. *Generación y cultivo de líneas y clones T*

Las biopsias se lavaron dos veces en medio de cultivo y disgregaron mecánicamente con una pipeta Pasteur. El material resultante se transfirió a placa de 24 pocillos y cultivó en IMDM (Gibco, Invitrogen Corporation, Paislay, Scotland) y 10 % de Suero A+ (SA) Humano sin IL-2 exógena, ni cualquier otro factor de crecimiento. Al cabo de 72 hs de cultivo los linfocitos se recogieron del fondo de la placa y se clonaron en placas fondo en U de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Denmark).

#### 2.1 *Protocolo Básico: Clonado de Linfocitos T*

El clonado de células T se realizó por dilución límite. Las células recogidas se contaron en cámara de Neubauer.  $1,2 \times 10^4$  células se resuspendieron en 6000 ul de medio de cultivo (IMDM, 10% SA, Penicilina/Streptomocina). A partir de esta concentración celular (100 células/50 ul/pocillo), se realizaron diluciones seriadas para obtener placas con 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6 y 0.3 células/pocillo. Las células se estimularon con 0.5  $\mu\text{g/ml}$  de PHA-L (L2769, Sigma Chemical, ST Louis, MO, USA) y  $5 \times 10^5$  PBMC autólogos irradiados (60 Gy, CLINAC<sup>R</sup> 2100C, Palo Alto, CA) como células alimentadoras ( "feeder cells" )<sup>1,2</sup>. Al cabo de 3 días, se añadió r IL-2 (provista por M. Gately, Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ).

Las células T se reestimularon cada 10 -14 días en las mismas condiciones, con la diferencia de que al cabo de la tercera estimulación se agregó una mezcla 1:10 de una línea B autóloga (preferentemente) transformada con el Virus Epstein Bar (B-LCL) y PBMC alogénicos también como células alimentadoras. En el cultivo la relación entre las células T, los PBMC y las líneas B linfoblastoides es 1:10:1 respectivamente. En placas de 96 por cada 5000 linfocitos T se agregaron 50000 PBMC y 5000 B-LCL preferentemente autólogos. Cuando la estimulación se realizó en placa de 24 (Nunc), la relación de alimentadoras se mantuvo, incrementándose el número de células: En un volumen final de 2 ml, entre 100.000 y 500.000 linfocitos T se estimularon con  $1 \times 10^6$  PBMC y  $1 \times 10^5$  B-LCL. Por último, cuando el número de linfocitos T a estimular alcanzó el millón de células, se agregaron  $1 \times 10^7$  PBMC y  $1 \times 10^6$  B-LCL. El cultivo se hizo en frascos de 25 cm<sup>2</sup> (Nuncclon) en un volumen final de 10 ml.

### 2.1.1 Protocolo asociado: Procesamiento de suero

El suero humano utilizado para el cultivo de clones se obtuvo a partir de extracciones realizadas a donantes voluntarios de sangre. Estos donantes eran hombres, grupo A<sup>+</sup> o AB<sup>+</sup> que no hayan recibido transfusiones y exentos de HIV+, hepatitis B(HBV), Hepatitis C (HCV), Ac's (*Treponema Pallidum*) y AC's irregulares anti-eritrocitos (no ABO ni Rh). El complemento se inactivó durante 30 min a 56 °C. Posteriormente se eliminaron los lípidos por ultracentrifugación (Centrikon T-1160, Kontron Instruments, Finlandia) a 30.000 RPM (100.000 g) durante 1 hr a 4 °C. Cada suero se alicuotó y congeló a -20 °C. Nota: RCF (g) = 1.12 x r (mm) x (RPM/1000)<sup>2</sup>.

### 2.1.2 Protocolo asociado: Test de sueros

El suero humano fue probado mediante ensayos de proliferación de PBL estimulados con PHA. Las estimulaciones se hicieron con diluciones crecientes de PHA (0, 2, 4 y 8 ug/ml) en placas de 96 fondo plano (NUNC). Al cabo de 72h el cultivo se pulsó con Timidina-H<sup>3+</sup> (metil-H<sup>3+</sup>Timidina en solución acuosa. AE: 74GBq/mmol- 2ci/mmol (Ref: TRA310) 5ml (185 MBq 5 mCi)) durante 18 hs. Para la validación del suero se tuvieron en cuenta los índices de proliferación y el nivel basal de incorporación del isótopo. Niveles bajos de proliferación en presencia de mitógeno, así como un nivel basal alto, fueron los criterios tomados para descartar el suero analizado.

### 2.1.3 Protocolo asociado: Titulación de IL-2 utilizando la línea CTLL-2

La concentración óptima de IL-2 se obtuvo a partir de la titulación realizada sobre una línea de ratón (CTLL-2) que depende de esta citocina para su crecimiento. El protocolo utilizado fue el siguiente: (1) Centrifugar las células CTLL-2 en 7 ml y resuspender en 2 ml de medio RPMI 20% SFB / 0.00005 M B2 ME. (2) Contar y llevar a 1 x 10<sup>5</sup> cel/ml para hacer el test. (3) Hacer diluciones seriadas desde 400 hasta 0 U/ml. en la misma placa de 96 (fondo plano). Sembrar el primer well con 100 ul de la dilucion de IL-2. Tomar 50 ul y comenzar las diluciones; (4) Sembrar 50 ul de la dilucion de células en cada pocillo. Saber que la concentracion final en el primer pocillo será de 100 ul/ml luego de agregar los 50 ul de células. Se puede empezar por una concentracion mas alta de IL-2; (5) Poner Timidina a las 24 h (es el tiempo que tarda en morir el pocillo control sin IL-2 que generalmente es de 24h; 6) Cosechar transcurridas 12 h; (7) Hacer grafica c.p.m vs concentración de IL-2. La cantidad de IL-2 seleccionada es la mínima a la que se alcanza el máximo de proliferación.

<sup>1</sup> El medio condicionado de células T estimuladas con mitógenos permitió el cultivo y clonado de células T. Este medio descubierto en 1976 tenía lo que se denominó T cell Growth Factor (*Science* 1976. 193: 1007. *Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows*). Este factor fue definido en el *First lymphokine workshop* de 1979 como IL-2.

### **2.1.4 Protocolo asociado: Aislamiento de PBMC por gradiente de Ficoll-Isopaque**

La separación de células mononucleares de sangre periférica se realizó utilizando gradientes de densidad en Ficoll-Isopaque (Lymphoprep™ 1077, Axis-Shield PocAS, Oslo, Norway)(Boyum, A (1968), Scand J. Clin. Invest., 21 (Suppl.97), 77-89)<sup>3</sup>. El método permite la separación de células mononucleares que tienen una densidad inferior a la de los polimorfonucleares (granulocitos) y eritrocitos. La separación en un medio isosmótico de densidad igual a 1,077 g/ml, permite que los eritrocitos y PMN sedimenten a través del medio y se forme una banda claramente visible con las células mononucleares entre la muestra y la interface medio/muestra. La sangre se diluye 1:1 en PBS (Phosphated buffer saline, Ph: 7, 2-7,4) y se aplica sobre el medio de centrifugación (Ficoll-Isopaque) procurando no romper la interfase. La muestra se centrifuga a 600g, 30 min a 20° C. La banda se recupera del gradiente y se lava 3 veces para eliminar restos de medio y plaquetas.

El Lymphoprep™ contiene: Diatrizoato de sodio (9.1 % p/v), Polisacárido (5.7 % p/v). Su densidad es de 1,077 g/ml.

### **2.1.5 Protocolo asociado: Irradiación de células**

La irradiación de las células se realizó en un acelerador lineal CLINAC<sup>R</sup> 2100C (Varian™, Palo Alto, CA en el Servicio de Radioterapia del Hospital Germans Trias i Pujol.). Esta máquina está dedicada al tratamiento radioterápico del cancer. La irradiación se llevó a cabo en un contenedor de metacrilato lleno de agua. En su interior existe una gradilla donde se sitúan los criotubos con las células a irradiar.

Las condiciones de irradiación fueron las siguientes:

Tipo de irradiación: Fotones de frenado (Bremsstrahlung photons). Energía de los fotones: 6 MV. Distancia fuente radiación a la superficie del contenedor: 56 cm. Tamaño del campo de irradiación: 25 x 25 cm a 100 cm de la fuente. Dosis administrada: 60 Gy. Tasa de irradiación en la mitad del contenedor: 15, 2 Gy/min. Homogeneidad del campo: mejor del 5%.

### **2.1.6 Protocolo asociado: Congelación de células**

Las células T fueron congeladas en una solución de SFB con 10% de DMSO (DimetilSulfóxido). Para un N° comprendido entre 50.000-500.000 cel se agregó 300 ul de la solución de congelación, entre 500.000 y 2x10<sup>6</sup> se congelaron en 500 ul de solución y para una cantidad superior a 4x10<sup>6</sup> se añadió 1 ml de solución. Las células se mantuvieron un mínimo de 20 min en gradillas de polispán en contacto con vapores de Nitrógeno. Posteriormente se las guardó en cajas de polispán en refrigerador a -70°C. Finalmente, en un plazo comprendido entre 1 y 7 días se almacenaron en tanques de Nitrógeno líquido (-196°C).

<sup>2</sup> La Leucoagglutinin (PHA-L) es una lectina obtenida de *Phaseolus vulgaris* (red kidney bean). Esta aglutinina (*Phaseolus vulgaris* agglutinin) consiste de dos especies moleculares: la PHA-E (Eritroaglutinina) con baja capacidad mitogénica y alta actividad eritroaglutinante y la PHA-L, altamente mitogénica y leucoaglutinante, pero poco aglutinadora de glóbulos rojos. Mitogénica a <5 ug/ml. Ref : Rigas, DA and Osgood, EE, J. Biol. Chem., 212, 607 (1955).

### 3. Cultivo de líneas celulares

#### 3.1 Protocolo Básico: Cultivo de líneas celulares

Todas las células se crecieron en RPMI 1640 suplementado con SFB (inactivado 30' a 56 °C) al 10%, 2mM Glutamina (Gibco), penicilina (100 u/ml) y estreptomycin (0.1 mg/ml). En el caso de algunas transfectantes se adicionó como medio de selección Geneticina a 1 mg/ml (G418, Gibco). Cuando las condiciones lo requerían también se suplementó el medio de cultivo con  $0.5 \times 10^{-5}$  M de B-Mercaptoetanol. Las células adherentes se repicaron tras el tratamiento con Tripsina/EDTA (Gibco). Los cultivos se hicieron en incubador a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub> ( Forma Scientific, USA)

Líneas celulares.

*Células epiteliales:* Las líneas Caco2, T84 y HT29 son células intestinales humanas establecidas a partir de carcinomas de colon (202) HT93 es una línea epitelial tiroidea (203) y la línea Hela deriva de un carcinoma de cervix.

*Células Linfoides:* Las células CEB21, CEB44 y Daudi son líneas linfoblastoides humanas (B-LCLs); la línea eritromieloide K562 se usó como diana celular de la actividad NK. HP62 es una línea pancreática. C1R es una línea B linfoblastoide que no expresa HLA-clase I. Las líneas C1R-CD1a, CD1b, CD1c y CD1d, fueron transfectadas con el vector pSR-a Neo más el gen codificante para CD1A, CD1B, CD1C y CD1D respectivamente. Estas transfectantes fueron provistas por PhD. Steve Porcelli (Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA). Las transfectantes C1R-MICA/B fueron cedidas por PhD Veronika Groh (180).

La línea P815 que expresa el receptor para Fc del las Ig's, se utilizó en ensayos de lisis dirigida.

*Líneas primarias:* Las células CD8+ se aislaron de PBMC por selección positiva utilizando las CD8 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany) y el separador MACS™ (Magnetic Cell Separator). Los enterocitos fueron provistos por el Dr. M. Martin Villa (Universidad Complutense, Madrid, Spain); TB260 y TB270 son células foliculares tiroideas (TFC) obtenidos como se describió en (204).

#### 3.1.1 Protocolo asociado: Cultivo de la línea CTLL-2

Entre  $2-3 \times 10^5$  cel/ml de la línea CTLL-2 se resuspendieron en medio RPMI 20% SFB/ 0.00005 M B2-ME, suplementados con 20 U IL-2 / ml. Las células normalmente se diluyen cuatro veces en medio con IL-2 cada 2-3 días.

<sup>3</sup> *Ficoll-Isopaque.* El método original descrito por Arne Boyum en 1968 utilizaba un compuesto de ácido metrizoico (PM 628) y Ficoll. El Lymphoprep reemplaza el metrizoato por el ácido diatrizoico. (PM: 614). Estos son compuestos derivados del ácido triodobenzoico, capaces de formar soluciones de alta densidad. Estos compuestos deben ser protegidos de la luz ya que su exposición a la luz visible y sobre todo a la UV (244nm), produce la liberación de los yodos del grupo bencénico. Estas moléculas iodadas (Isopaque) eran utilizados en líquido de contraste para las radiografías en rayos -X.

### **3.1.2 Protocolo asociado: Tratamiento para *Mycoplasma***

La infección por *Mycoplasma* en células T se eliminó con Clorhidrato de Ciprofloxacino (Bayer). Se usó a 10 µg/ml durante 2-3 semanas. Las líneas celulares se trataron con BM-Cyclin (BM-Cyclin1:Pleuromutilin derivative y BM-Cyclin2:Tetracycline derivative) de Roche, Applied Science, Mannheim, Alemania)

### **3.1.3 Protocolo asociado: Transformación con el Virus de Epstein Bar**

Para la obtención de líneas Linfoblastoides, los Linfocitos B provenientes de PBL, fueron inmortalizados con el virus del Epstein Bar. Entre 5-8 x10<sup>6</sup> PBL se colocaron en tubos cónicos de 15 ml. Durante el primer día las células se colocan con 1 ml de sobrenadante de la línea Mormoset (Productora del virus) y Ciclosporina A para inhibir posibles linfocitos T reactivos contra células B presentadoras del virus, en un volumen final de 10 ml (con el tapón del tubo semi cerrado. Pasadas 24 h se centrifugan las células, se descarta el sobrenadante y se agrega medio nuevo más ciclosporina. Al cabo de 7 días, se renovó la mitad del medio (más ciclosporina). Al día 14 se centrifugaron las células y se las resuspendió en 1 ml de medio de cultivo. Las células se transfirieron seis días más tarde a 2 pocillos de una placa de 24 pocillos. El medio de cultivo utilizado para la inmortalización de las células B, fue RPMI, 15 %SFB (Gibco), Glutamina (Gibco), Piruvato (Gibco), Penicilina, Streptomycin. La concentración final de Ciclosporina A es de 4 µg/ml.

### **3.1.4 Protocolo asociado: Estimulación con IFN- $\gamma$**

Las células (1x10<sup>6</sup>) se sembraron en placas de seis pocillos (Costar) en un volumen final de 3 ml. Luego de 24 hs se estimularon con IFN- $\gamma$  a una concentración final de 500 U/ml durante 48h.

## **4. Inmuncaciones. Citometría de flujo**

### **4.1 Protocolo básico: Tinción de superficie con AcMo's**

La tinción de células con AcMo específicos de marcadores de superficie se realizó según los protocolos clásicos de inmunomarcación. Las células se resuspendieron normalmente en 100 µl de PBS con la dilución óptima de cada AcMo. Los Ac's se incubaron durante 30 min en hielo. Luego se lavaron dos veces con PBS. En el caso de tinciones indirectas se utilizó un Ac secundario de cabra anti ratón conjugado con FITC o PE (Goat anti-mouse-FITC (Southern Biotechnologies, Birmingham, AL, USA) ). Los Ac's utilizados se enseñan en la **tabla I**. Las tinciones fueron analizadas en un citómetro FACScan® (Becton Dickinson) utilizando el programa informático CellQuest™ (Becton Dickinson).

Para las tinciones intracitoplasmáticas se utilizó el reactivo Fix&Perm® (Caltag, Burlingame, CA, USA) previo a la incubación del anticuerpo.

Proteína		Clon- mAB	HB	IG´s	Procedencia
CD1a		OKT6			ATCC
CD1b		WM25			M. Brenner
CD1c		L161			Immunotech
CD1d		CD1d51.1.3			S. Porcelli
CD2		204-12			Ramón Vilella
CD2		OKT11			Immunotech
CD2		SE5.2			Ramón Vilella
CD3		Leu4a FITC/PE			Beckton-Dickinson
CD3		OKT3			ATCC
CD4		Leu3-FITC			Beckton-Dickinson
CD4		72.5A4			Ramón Vilella
CD8a		Leu2a-PE			Beckton-Dickinson
CD8a		43-44			Ramón Vilella
CD8β		2ST8-5H7		G2a	M.D Ellis L. Reinherz
CD11a	LFA-1	TS1/22.1	HB202		Sánchez-Madrid
CD16		Leu-11a			(Beckton-Dickinson)
CD28		158-2E10			Ramón Vilella
CD28		9.3			A.Ledbetter
CD28		Leu-28-PE			Beckton-Dickinson
CD49d	VLA-4	HP2/4			Sánchez-Madrid
CD50	ICAM-3				Ramon Vilella
CD54		RM3A5			P.Engel
CD56		Leu-19			Beckton-Dickinson
CD58	LFA-3	TS2/9.1.4.3	HB205		Sánchez-Madrid
CD94		3B1			López Botet
CD103		BLy-7			Immuno Quality
CD103		BLy-7-FITC			Immuno Quality
TCR αβ		WT31-FITC			Beckton-Dickinson
TCR αβ		BMA031			Endogen
TCR γδ		TCRδ1-FITC			Beckton-Dickinson
TCR γδ		TCRδ1			Michael Brenner
TCR γδ		IMMU510		G1	Immunotech
TCRVa2				G2a	Labgen (Labclinics)
TCRVb8	TCRBV8S1	56C5.2		G2a	Immunotech
CCR5		2D7-PE			Beckton-Dickinson
CXCR4		12G5-PE			Beckton-Dickinson
CCR7		2H4			Beckton-Dickinson
CXCR3		49801.111			R&D
CLASE I		W632			ATCC
CLASE II		L243			ATCC
NKG2D		1D11			Veronika Groh
MICA/B		6D4			Veronika Groh
MICA/B		SR116			Sophie Calliat
MICA/B		SR104			Sophie Calliat

**Tabla I:** Anticuerpos utilizados en el estudio.

Para los ensayos funcionales se utilizaron los siguientes AcMo: Immu510 (anti-TCR $\gamma\delta$ ), W6/32 (anti-HLA class I); OKT3; 204-12 (anti-CD2), S5.2; 143-44, 72.5A4, BMA031, Bly-7, 1D11, SR116, SR104 y 6D4.

#### **4.1.1 Protocolo asociado: Inmunomarcación en placa de 96 fondo V**

La inmunomarcación en placa de 96 se utilizó para marcar simultáneamente un número elevado de clones y/o cuando el número de células a teñir era limitado ( $1-2 \times 10^4$ ). Este método es rápido y reduce, además del número de células, la cantidad total de Ac. Se utilizaron 10  $\mu$ l de AcMo diluido en PBS que se incuban con 50  $\mu$ l de células durante 30 min a 4°C. Luego de lavar con 200  $\mu$ l de PBS, se decanta el sobrenadante por inversión de la placa sobre papel de filtro. Se repite el proceso dos veces. Finalmente las células se resuspenden en 200  $\mu$ l de líquido para citometría (Facs Flow, BD).

## **5. Estudios Funcionales**

### **5.1 Protocolo Básico: Determinación de la actividad citotóxica de las células T**

La caracterización de la especificidad de las células T se realizó mediante ensayos de citotoxicidad. La citotoxicidad fue testada contra diferentes células diana usando un protocolo standard de 4 horas de liberación de  $^{51}\text{Cr}$  ( $^{51}\text{Cr}$  in saline, 1mCi/ml, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

Los enterocitos, células foliculares tiroideas (CFT) y líneas adherentes fueron marcadas en cultivo 16 hs con 100  $\mu$ Ci de  $^{51}\text{Cr}$  en 3 ml de RPMI + 50% de SFB, mientras que las células no adherentes, con 50  $\mu$ Ci  $^{51}\text{Cr}$  a 37 °C y 5 % de  $\text{CO}_2$  durante 1h. La cantidad de células diana varió entre las 1000 y 5000 células por pocillo. Las células efectoras se sembraron a distintas relaciones dependiendo el ensayo. Los cultivos se realizaron en RPMI + 5% de SFB por duplicado en placas de 96 fondo en fondo V (Nunc). La liberación máxima de Cr se hizo en presencia de Tritón 2% (50 $\mu$ l células diana + 100  $\mu$ l de Tritón 2%) y la espontánea en presencia de RPMI, ambos por triplicado. Al cabo de 4 hs las placas se centrifugaron 3 min a 170 x g (900 RPM, centrífuga MinifugeT, Heraeus, GmbH HerausstraBe 12-14, Hanau, Alemania) durante 3 min. El  $^{51}\text{Cr}$  liberado se midió en un contador de centelleo Microbeta (1450 Microbeta Liquid Scintillation Counter, Wallac Oy, Turku, Finlandia).

El porcentaje de lisis se calculó siguiendo la fórmula standard:  $(\text{lisis célula diana} - \text{lisis espontánea}) / (\text{lisis máxima} - \text{espontánea}) \times 100$ .

#### **5.1.1 Protocolo alternativo: Inhibición de la citotoxicidad**

Para los ensayos de inhibición se incubaron las células efectoras o dianas con los AcMo a concentraciones saturantes durante 30 min a 4°C, antes de mezclar las células. La inhibición representa la diferencia entre el porcentaje de lisis sin Ac menos el porcentaje obtenido con el Ac. El porcentaje de inhibición se calculó mediante la siguiente fórmula:  $[1 - (\% \text{ lisis en presencia de mAb} / \% \text{ lisis en ausencia de mAb})] \times 100$ .

### **5.1.2 Protocolo alternativo: Inhibición de la lisis por células frías**

Las células efectoras y dianas (calientes) se ajustan a la relación deseada (pe; E:T=10:1). Las dianas frías se agregan en el cultivo a una relación diana fría: caliente de 16:1, 4:1 y 1:1. El porcentaje de lisis se calculó según la fórmula:  $[1 - (\% \text{ lisis en presencia de células frías} / \% \text{ lisis en ausencia de células frías})] \times 100$ .

### **5.1.3 Protocolo alternativo: Inhibición de la exocitosis de los gránulos de perforina e inhibición de la vía de las caspasas**

Para la inhibición de la lisis mediada por gránulos de Perforina, las células T se preincubaron durante 2 h a 37 °C con 10-1000 ug/ml de Concomycina A (CMA, Sigma-Aldrich). Durante el ensayo de 4 h de liberación de  $^{51}\text{Cr}$  la droga permanece en el cultivo (205). Para la inhibición de la lisis inducida por FASL, se añadió a la placa de citotoxicidad 20-50 uM de ZVAD-FMK (Sigma-Aldrich). El ZVAD-FMK es un inhibidor de la vía de las caspasas.

### **5.1.4 Protocolo alternativo: Lisis redirigida sobre la línea P815**

Se denomina lisis redirigida ya que la interacción entre el receptor de la célula efectora con la célula diana está favorecida por un Ac. Este Ac se une a la célula diana a través de un receptor Fc (Fragmento Constante de las Ig's) y a la célula efectora por su región variable. Como diana celular se utilizó la línea P815. Una vez marcada con  $^{51}\text{Cr}$  las células se sembraron a razón de 1000/5000 células/pocillo y se incubaron con el Ac a distintas diluciones. La relación efectora : diana, permaneció constante.

## **5.2 Protocolo Básico: Proliferación de linfocitos T**

Las células (PBL CD8+ y células T  $\gamma\delta$ -clon EC9.90) fueron estimuladas con Ac's anti-CD3 (OKT3) con y sin Ac's anti-CD28 (158-2E10), NKG2D (1D11) or CD2 (204-12) en placas de 96 fondo plano (Nunc) previamente tratadas con Ac's de cabra anti - cadena  $\gamma$  de ratón (Ver más adelante; apartado 5.3.2). Las células se incubaron a  $5 \times 10^4$  células/pocillo en 100 ul de volumen final. Al cabo de 72 hs se agregó  $1 \mu\text{Ci}$  Thymidine ([methyl- $^3\text{H}$ ] a  $1 \text{mCi/ml}$  en solución acuosa, Amersham Biosciences). Luego de 18 hs se transfirió el cultivo en membranas de fibra de vidrio FilterMat (Skatron, Lie, Noruega) y la cantidad de isótopo incorporado se determinó en un contador Microbeta (1450 Microbeta Liquid Scintillation Counter, Wallac Oy, Turku, Finlandia)

## **5.3 Protocolo Básico: Determinación de Citoquinas por Citometría (CBA-Cytometry Bead Array)**

La determinación y cuantificación de citoquinas en el sobrenadante se realizó por citometría de flujo mediante CBA (Human Th1/Th2 Cytokine Cytometric Bead Array Kit (CBA, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Este sistema permite cuantificar en una sola muestra los niveles de Interleuquina-2 (IL-2), Interleuquina-4 (IL-4), Interleuquina-5 (IL-5), Interleuquina-10 (IL-10), Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) por citometría de flujo (206), a partir de

standares de concentración conocidos.

25 ul de cada sobrenadante (previamente diluido 1/20 en tampón de muestra) se mezclaron con igual volumen de los Ac asociados a las bolas (Beads) y con 25 ul del reactivo de detección (Ac-PE específico para cada citoquina). La mezcla se incubó durante 3 hs a T° ambiente. La adquisición de los datos se realizó usando un citómetro de flujo FACscan® y posteriormente analizados con el programa informático BD Cytometric Bead Array (CBA).

### **5.3.1 Protocolo alternativo: ELISA (Enzyme Linked Immuno-abSorbent Assay)**

Algunas muestras se analizaron para IL-4 e IFN- $\gamma$  por ELISA siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante (Diaclone Research, Besançon, France). La absorbancia a 450 nm se midió en un espectrofotómetro (Biochem Immunosystems ELISA reader, Casalecchio di Reno, Italy).

### **5.3.2 Protocolo asociado: Estimulación de células T para la producción de citoquinas**

Para los ensayos de producción de citoquinas, las células T ( $5 \times 10^4$ ) se estimularon con diferentes combinaciones de anticuerpos en placas de 96 pocillos fondo plano (Nunc). Las placas se preincubaron con Ac de cabra anti - cadena  $\gamma$  de ratón (goat anti-mouse  $\gamma$  chain (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Alabama). La adsorción del Ac a la placa se realizó incubando en cada pocillo 3 ug de este en 30 ul de PBS durante 90 min en incubador a 37 °C. El exceso de anticuerpo se lavó tres veces con PBS y una con RPMI. Posteriormente se agregaron las células y los Ac's en un volumen final de 100 ul. Cada combinación se realizó por duplicado. Los sobrenadantes se recogieron luego de 24 y 48 hs.

### **5.4 Protocolo Básico: Citoadherencia de Linfocitos T sobre secciones de epitelio intestinal**

Para la citoadherencia de células T se utilizaron tejidos de yeyuno obtenidos de pacientes sometidos a gastroplastia (Dr. Alastrue) o de biopsias intestinales de pacientes celíacos (Gastrología Hospital San Joan de Deu y Can Ruti). Estos se incluyeron en Bright-Cryo-M-Bed (Cambs, PE29 6EU, Reino Unido) y congelaron en N<sub>2</sub> líquido usando una interfase de isopentano. Secciones de criostato de 4-5 micrones se montaron en portaobjetos y se deshidrataron a T° ambiente durante toda la noche. Los cortes envueltos en film plástico se guardaron a -20 °C hasta su uso.

Las células T se incubaron con AcMo anti-HLA clase-I (W6/32) durante 1 hr a 4°C. Luego de lavar el Ac, se incubaron las células sobre cortes de Tejido durante 1 hr a 4°C. Luego de lavar las células con PBS, se fijaron en paraformaldehído 4% durante 5 min, y se inhibió la peroxidasa endógena con 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 min a T amb. Posteriormente se lavó en PBS y se incubó con un Ac biotinilado de cabra anti - ratón dilución 1/100 (Southern) durante 30-30 min a 4 °C. Luego de lavar con PBS, se incubó con streptavidina-HRP (Horseradish-Peroxidase-Streptavidin, ATOM) a una concentración final de 5 $\mu$ g/ml durante 30 min a T° ambiente. Posteriormente se lavó con PBS y reveló con DAB (3,3-Diamino.Benzidine-4HCL, SERVA, Heidelberg, Alemania) en una solución de PBS (50 mg DAB, 200 ml PBS, 200 ul H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante aproximadamente 5 min hasta

la aparición de color. Los preparados fueron contrastados con Hematoxilina-Eosina, montados en DPX y observados al microscopio.

La fotografía se realizó con el sistema confocal utilizando un Microscopio óptico de fluorescencia Zeiss Axioskop 2 ( Zeiss, Alemania). Las imágenes se capturaron con una Cámara color Hamamatsu C5810 y analizaron mediante el sistema de tratamiento digital de imágenes Openlab (Improvision Ltd. Inglaterra) en Apple Macintosh G3 y G4 utilizando deconvolución digital, morfometría y reconstrucción 3D.

#### **5.4.1 Protocolo asociado: Tinción Hematoxilina-Eosina**

Los cortes se tiñeron con heatoxilina – eosina de la siguiente manera: Sucesivamente se incubaron 2 min con hematoxilina, lavan con H<sub>2</sub>O del grifo, incuban con Eosina 30 seg. Luego se deshidrataron 10 seg con EtOH 70%, 10 seg con EtOH 95%, 2 min EtOH 100%, 1 min con Xilol. Los cortes se montaron en DPX.

## B- Técnicas de Biología Molecular

## 6. Estudios moleculares

6.1 Protocolo Básico: Análisis del TCR  $\gamma\delta$  por RT-PCR

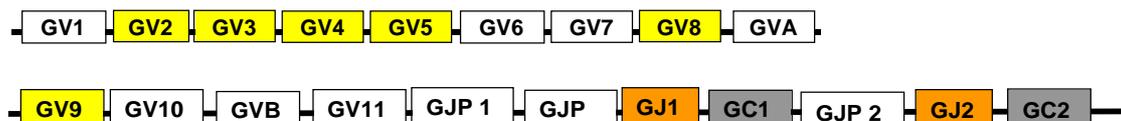
Alicuotas de 1ul del cDNA obtenido de diferentes líneas y clones de células T se sometieron a amplificación por PCR usando cebadores de oligonucleótidos 5' específicos para 4 familias V $\gamma$  y 8 V $\delta$  (207). Los cebadores específicos para V $\delta$ 7 y V $\delta$ 8, correspondientes a V $\alpha$ 28 y V $\alpha$ 14 son los descritos por Genevée et al (208). Para los extremos 3' se utilizaron cebadores específicos de las regiones TRGC y TRDC (**Tabla II**)<sup>4,5</sup>.

La amplificación se realizó en un volumen final de 10 ul con 0.25 ul de DNA polimerasa (Finnzymes, Espoo, Finland) y 5 pmol de cada cebador en un termociclador 2400 de Perkin Elmer (PE, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Se realizaron 30 ciclos de amplificación, cada uno de 30 seg de desnaturalización a 94 °C, 30 seg de unión a 62°C (V $\gamma$ ) o 56° C (V $\delta$ ) y 45 seg de elongación a 72° C, seguidos de 5 min de extension final.

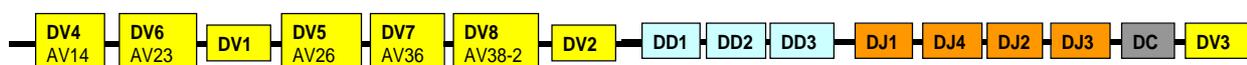
Subgrupo	TRGV	F	Cebador	Ac MoEspecíficos
1	GV1	No	GGAGAACGAAGTCAGTCA	4A11 56.3(#1773)  R4.5
	GV2	Si		
	GV3	Si		
	GV4	Si		
	GV5	Si		
	GV6	No		
	GV7	No		
	GV8	Si		
2	GV9	Si	CCAGTACTAAAACGCTGTC	Ti-gammaA/ Immu360
3	GV10	NO	CAGCTATCCATTTCACGG	
4	GV11	NO	GCAAATAAGAGTGCCAC	
A	GVA	NO		
B	GVB	NO		

TRDV	TRAV	F	T(nt)	Cebador	AcMo	generico
DV1		si	291	TCTGGATCAAGTGTGGC	$\delta$ -TCS1(#92 y )	Immu510
DV2		si	261	TCTGGGCAGGAGTCATGT	BB3	TCR $\delta$ 1
DV3		si		GGCACGCTGTGTGACAAA	P11.10b(#317)	
DV4	AV14	si		GACACCAGTGATCCAAGTT		
DV5	AV26	si		GATGACCAGCAAGTTAAGC		
DV6	AV23	si		TATCATGGATTCCCA		
DV7	AV36	si	267	TGGTTGTGCACGAGCGAGACACTG		
DV8	AV38-2	si		CCCAGCAGGCAGATGATTCTCGTT		

**Tabla II:** Cebadores para las cadenas gamma y delta del TCR. (F) Funcional, (T) tamaño amplímero



**Figura I:** Representación esquemática del locus TCR gamma. V=variable; J=Joining; C= Constante



**Figura II:** Representación esquemática del locus TCR delta. V=variable; D= Diversidad; J= Joining; C= Constante

<sup>4</sup> Locus TCR Gamma. El locus Gamma del TCR (TRG) está ubicado en el cromosoma 7, en la posición 7p14. Lo componen 19-22 genes dependiendo del haplotipo. El reordenamiento de los genes variables TRG V-J, puede dar lugar a  $10^{EE}4$  cadenas gamma diferentes.

Existen entre 12-15 TRGV pertenecientes a 6 subgrupos (1-2-3-4-A y B) (**figura I**). De estos genes variables, sólo 6 son funcionales, mientras que el resto presentan deleciones, codones stop, alteraciones en secuencias de splicing o marcos abiertos de lectura que impiden su correcta transcripción y/o traducción. No existen segmentos de diversidad como los presentes en el locus Delta. Si existen dos clusters de segmentos J-C, el primero formado por 3 TRGJ (TRGJP1, TRGJP y TRGJ1) y un gen TRGC1 y el segundo formado por 2 TRGJ (TRGJP2 y TRGJ2) y un gen TRGC2. La inserción y/o deleción de los genes TRGV4 y TRGV5 dan lugar a haplotipos de 12 o 14 TRGV. La mayoría de los linfocitos T  $\gamma\delta$  de sangre periférica expresan el rearreglo TRGV9-JP-C1. La cadena del gen TRGC1 se asocia con la cadena delta a través de un puente disulfuro por una cisteína ubicada en el segundo exón. El segmento TRGC2 carece de esta cisteína. Este alelo es polimórfico presentando un exón 2 homólogo al C gamma1 con dos otras copias del mismo. La cadena gamma resultante codificará una proteína de entre 40-55 kDa. Podemos encontrar cuatro formas de cadena gamma. La cadena gamma1 (TRCG1) de 40kDa, dos cadenas Gamma2 de 40 o 44 kDa producidas por patrones distintos de glicosilación del exón 2 duplicado y una cuarta forma de 55 kDa codificado por el gen C gamma2 con el exón 2 triplicado.

Antes de establecerse la nomenclatura para la designación de las cadenas gamma y delta, aparecen alternativamente en publicaciones anteriores a 1999 la denominación de Vgamma 2 o V gamma 9 para lo que hoy se conoce como TCRGV2

### 6.1.1 Protocolo Alternativo: Secuenciación del TCR $\delta$ (TRDV1)

Las regiones TRDV1 se secuenciaron mediante la incorporación de dinucleótidos marcados con distintos fluorocromos (BygDye Terminator method, Perkin Elmer). La secuenciación se realizó sobre 30-90 ng de producto de PCR previamente purificado en columnas de fibra de vidrio (GFX PCR DNA and gel band purification kit, Amersham Biosciences), 3  $\mu$ l de "Terminator ready reaction mix", 0,5  $\mu$ M de primers 5'-3' y completado con H<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 10  $\mu$ l. La amplificación se hizo en un termociclador PE2400 (Perkin-Elmer). Se realizaron 30 ciclos de amplificación que comprendían una desnaturalización a 96°C 10 seg, unión a 50°C 10 seg y extensión a 60°C durante 2 min. Los dideoxinucleótidos no incorporados se eliminaron mediante precipitación con KAc 3M y EtOH 100%. A 10  $\mu$ l de la reacción de secuenciación se añade 1  $\mu$ l de Kac 3M (0,08 M [ ] final), 2,5 vol de EtOH (28,75  $\mu$ l) y 0,5  $\mu$ l de glucógeno (20 mg/ml). Se deja en hielo 10 min y se centrifuga 30 min en microcentrifuga (14.000 rpm). Luego de eliminar el alcohol, se lavó con EtOH 70 %. Tras centrifugar 2 min a 14.000 rpm, se descartó el alcohol con cuidado y se secó a T° ambiente durante 5 min aproximadamente. El precipitado se resuspende en 25  $\mu$ l de TSR (Templete suppression Reagent) y se rehidrata durante 10 min a T° ambiente, homogeneiza con vortex y desnaturaliza a 94°C durante 3min. Luego de dejar la muestra 5 min en hielo, se cargó en un sistema automatizado de electroforesis en capilar (ABI-Prism 310 genetic analyzer) sobre el polímero POP-6. Los datos generados de la electroforesis fueron analizados con la ayuda del programa ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer (PE, Applied Biosystems).

### 6.2 Protocolo Básico: Análisis del TCR $\alpha\beta$ por RT-PCR

El análisis del TCR  $\alpha\beta$  se realizó de manera semejante a la descrita para el TCR  $\gamma\delta$ . Se analizaron un total de 29 familias TRVA (**tabla III**) y 19 TRVB (**tabla IV**) (208,209). Se utilizó el Termociclador PE 480 (Perkin Elmer). Para las familias TRVA se realizaron 30 ciclos de amplificación, de 1 min de desnaturalización a 94 °C, 1 min de unión a 60 °C y 1 min de elongación a 72 °C, seguidos de 5 min de extensión final. Para las familias TRVB se utilizó el mismo protocolo pero con una temperatura de hibridización de 55 °C<sup>6,7</sup>.

<sup>5</sup> Locus TCR Delta. EL locus DELTA del TCR (TRD) está ubicado en el cromosoma 14, en la posición 14q11.2. Lo componen 16 genes que están incluidos dentro del locus ALFA del TCR (TRA) (**figura II**). EL reordenamiento de los genes variables TRD V-D-J, potencialmente puede dar lugar a 10<sup>8</sup> combinaciones posibles. La gran diversidad de cadenas es posible gracias a la adición y/o delección de nucleótidos que realiza al azar la deoxinucleotidil transferasa terminal en la región V-D-J. En la región de diversidad se pueden encontrar de 2, hasta tres regiones TRDD en tandem, pudiéndose generar hasta 4 zonas de acción de la transferasa cuando se utilizan 3 TRDD. La longitud del CDR3 varía de entre 6 y 21 aa. El cluster de genes delta sólo utiliza un fragmento constante TRDC, a diferencia de la gamma que puede reordenar hasta 2 genes TRGC. La cadena delta resultante codificará una proteína de entre 40-50 kDa.

### 6.2.1 Protocolo Alternativo: Secuenciación del TCR $\alpha$ 2 (TRVA12)

Las regiones TRVA12 fueron secuenciadas siguiendo el mismo protocolo que el utilizado para el TRVD1. Los cebadores están descritos en la Tabla III.

### 6.2.2 Protocolo Alternativo: Análisis de longitud del CDR3 (Spectratyping)

La longitud de los fragmentos del CDR3 de las zonas variables del TCR se determinó mediante electroforesis en capilar. Las amplificaciones para cada segmento TCRVA o TCRVB se realizaron como se indicó anteriormente. La diferencia radica en que el primer TRC 3' está marcado en el extremo 5' con una molécula fluorescente de FAM que permite que el amplímero sea detectado. Dos  $\mu$ l del producto de amplificación (previamente diluido 1/10 o 1/20 en H<sub>2</sub>O) y 1  $\mu$ l de electroforesis en capilar (ABI-Prism 310 genetic analyzer) para la determinación del tamaño y la intensidad de fluorescencia del amplímero. Los datos obtenidos de la electroforesis fueron analizados con la ayuda del programa GeneScan (Perkin-Elmer)

El marcador de tamaño interno TAMRA 500 está compuesto por fragmentos de longitud conocidos y marcados con un fluorocromo (TAMRA) diferente al utilizado para la amplificación.

Cebador TRBC 3'-FAM: 5'-(Fluoram6FAM) TTTTGGGTGTGGGAGATCTC-3' GENSET Corp. Diluido en E:E y almacenado a -20° C.

### 6.2.3 Protocolo asociado: Aislamiento de RNA

Se utilizaron dos protocolos para la obtención del RNA dependiendo de la cantidad de células del que se partía.

(a) Para un número de células superior a 10<sup>6</sup> se utilizó el método descrito por P.Chomczynski y N. Sacchi (210). A una solución de GSA se le agrega B-Mercaptoetanol y Fenol (1:0.040:1). Por cada 1-3 x10<sup>6</sup> células se agregan 600  $\mu$ l de la solución sobre el pellet seco. Dejar 5 min a temp ambiente. Agregar 120  $\mu$ l de cloroformo-isoamilalcohol (49:1), homogeneizar por inmersión 30 seg y dejar 15 min en hielo. Centrifugar a 14000 rpm durante 30 min a 4 °C. Recuperar la fase acuosa y precipitar con 1 volumen de isopropanol. Dejar 2hs a -20 °C. Centrifugar a 14000 rpm durante 30 min a 4 °C. Descartar el sobrenadante cuidando el pellet. Lavar el pellet 2 veces con

<sup>6</sup> *Locus TCR Alfa: EL locus ALFA del TCR (TRA) está ubicado en el cromosoma 14, en la posición 14q11.2. Lo componen 116 genes incluidos los 5 genes TRAV/DV, que se extienden a lo largo de 1000 kb. Se dividen en 54 genes TCRAV, 61 TRAJ y un único TRAC. El número potencial de genes funcionales es de 95-97 por genoma haploide. De estos 44-46 son genes TRVA y 50 TRAJ. Hay un único gen funcional TRAC. EL reordenamiento de los genes variables TRA V -J, potencialmente puede dar lugar a 10<sup>4</sup> combinaciones posibles. La gran diversidad de cadenas es posible gracias a la adición y/o delección de nucleótidos que realiza al azar la deoxinucleotidil transferasa terminal en la región V-J. La cadena alfa resultante codificará una proteína glicosilada de entre 43-49 kDa.*

etanol 70 % (-20). Para eso agregar 1 ml de etanol y centrifugar a 10000 RPM 10 min a 4 °C. Descartar el sobrenadante. Dejar secar el EtOH restante al aire o bien con el vacío. Resuspender el pellet en 10/20 ul de H<sub>2</sub>O DEPC (Di-etil-pirocarbonato).

*Nota: GSA (50 ml) = 23,6 g de Isotiocianato de Guanidina (CH<sub>5</sub>N<sub>3</sub> HSCN), 2.5 ml de Acetato sódico (\*) ph:4.0 y 2.5 ml de Sarcosil 10%).*

*(\*) 50 ml de Acetato sódico se preparan con 6.8 gr de AcNa , 10 ml de Acético Glacial y enrase con H<sub>2</sub>O. Se debe homogeneizar el AcNa con vortex teniendo cuidado cuando se agrega el H<sub>2</sub>O porque a medida que se disuelve aumenta el volumen (Reacción endotérmica).*

(b) Protocolo RNAqueous™-4PCR kit (Ambion, Austin, Texas, USA)

Para un número de células cercano a 10<sup>5</sup>, se utilizó este sistema comercializado por Ambion.

### 6.2.4 Protocolo asociado: Retrotranscripción

El RNA aislado y resuspendido en H<sub>2</sub>O-DEPC se retrotranscribió utilizando cebadores de oligo-dTTP y la retrotranscriptasa aislada del MMLV (SuperScript™ II, Gibco). La retrotranscripción se realizó durante 1hr a 42 °C, previa desnaturalización del RNA (1-2 ug) a 68 °C 5 min y renaturalización en hielo. Terminado el proceso, la enzima se inactivó durante 3 min a 95°C. El cDNA se diluyó en E:E (Epps: EDTA) hasta un volumen final de 50 o 100 ul (**tabla V**).

Ocasionalmente se utilizó la RT de Promega (M-MLV RT, Rnase H Minus Point Mutant , Promega, Madison, WI 53711-5399, USA).

Número de dNTPs	[ ] Inicialug/ml	[ ] Inicial uM	[ ] Final uM
12 OdNTP	500	8.11	0.4
15 OdNTP	500	10.1	0.5
18 OdNTP	500	12.1	0.6
20 OdNTP	500	13.5	0.67

*Nota: Relación entre la Molaridad, la [ ] ug/ml y tamaño del Oligo. La concentración óptima inicial de OdNTP (12-20) es de 500 ug/ml para la reacción de retrotranscripción. Dependiendo de la longitud del oligo, cambia la molaridad*

<sup>7</sup> *Locus TCR Beta. EL locus Beta del TCR (TRB) está ubicado en el cromosoma 7, en la posición 7q34. Lo componen ente 82-85 genes, que se extienden a lo largo de 620 kb. Lo integran 64-67 genes TCRBV, 2 TRBD, 14 TRBJ y dos TRBC. Excepto el gen TRBV30 que está 3' del gen TRBC2 en posición invertida, el resto están ubicados 5' del grupo de genes de la región TRBD-J-C que se encuentra duplicada. El primer grupo está comprendido por 1 único gen TRBD, 6 TRBJ y el gen TRBC1. El segundo grupo lo componen 1 un gen TRBD, 8 TRBJ y el gen TRBC2. El número potencial de genes funcionales es de 56-65 por genoma haploide. De estos 40-48 son genes TRBV, 2 TRBD y 12-13 TRBJ 2 TRBC. Hay dos genes funcional TRBC. EL reordenamiento de los genes variables TRBV-D -J, potencialmente puede dar lugar a 10<sup>6</sup> rearreglos posibles asociados a uno de los segmentos TRBC. La cadena beta resultante codificará una proteína glicosilada de entre 38-44 kDa. Rowen et al nueva nomenclatura (Science, 272, 1755-1762 (1996)*

Subgrupo	TRAV	Nomenclatura antigua	T (nt)	F	PRIMER Genevee, et al (208)
(1)	1	AV1-1	7S1		GCAACATGCTGGCGGAGCACCCAC
		AV1-2	7S2		GCAACATGCTGGCGGAGCACCCAC
	2	AV 2	11S1		CGCTGCTCATCTCCAGGTGCGGG
	3	AV 3	16S1		TCAACGTTGCTGAAGGGAATCCTC
	4	AV 4	20S1		TCCCTGTTTATCCCTGCCGACAGA
	5	AV 5	15S1		TTGCAGACACCCAGACTGGGGACT
	6	AV 6	5S1		CGGCCACCCTGACCTGCAACTATA
(2)	8	AV 8-1	1S1		GGCATTAAACGGTTTTTGAGGCTGGA
		AV 8-2	1S5		GGCATTAAACGGTTTTTGAGGCTGGA
		AV 8-3	1S4		GGCATTAAACGGTTTTTGAGGCTGGA
		AV 8-4	1S2		GGCATTAAACGGTTTTTGAGGCTGGA
		AV 8-5			
		AV 8-6	1S3		GGCATTAAACGGTTTTTGAGGCTGGA
		AV 8-7			
(3)	9	AV 9-1			
		AV 9-2	22S1		CCTGAAAGCCACGAAGGCTGATGA
	10	AV 10	24S1		CTGGATGCAGACACAAAGCAGAGC
	11	AV 11			
	12	AV 12-1	2S3	340	CAGTGTTCAGAGGGAGCCATTGT
		AV 12-2	2S1		CAGTGTTCAGAGGGAGCCATTGT
		AV 12-3	2S2		CAGTGTTCAGAGGGAGCCATTGT
	13	AV 13-1	8S1		CATTTCGTTCAAATGTGGGCAAAG
		AV 13-2	8S2		
	14	AV14/DV4	6S1-ADV6S1		TCCGCCAACCTTGTCATCTCCGCT
	15	AV 15			
	16	AV 16	9S1		CCAGTACTCCAGACAACGCCTGCA
	17	AV 17	3S1		CCGGCAGCAGACACTGCTTCTTA
	18	AV 18			
	19	AV 19	12S1		TCGTCCGAACTCTTTTGATGAGCA
	20	AV 20	30S1		
	21	AV 21	23S1		TGCCTCGCTGGATAAATCATCAGG
	22	AV 22	13S1		TTCATCAAACCCTTGGGACAGC
23	AV 23/DV6	17S1-ADV17S1		TGGGAAAGCCGTCATTATTGAT	
24	AV 24	18S1		CAGCACCAATTTACCTGCAGTT	
25	AV 25	32S1			
26	AV 26-1	4S2		TTGGTATCGACAGCTTCACTCCCA	
	AV 26-2	4S1		TTGGTATCGACAGCTTCACTCCCA	
27	AV 27	10S1		CACTGCGGCCAGCCTGGTGATAC	
28	AV 28				
29	AV 29/DV5	21S1-ADV21S1		AGCAAAATTCACCATCCCTGAGCG	
30	AV 30	29S1		GAAGGGTGGAGAACAGATGCGTCCG	
31	AV 31				
32	AV 32				
33	AV 33				
34	AV 34	26S1		AGCGCAGCCATGCAGGCATGTACC	
35	AV 35	25S1		TGGCTACGGTACAAGCCGACCCCT	
36	AV 36/DV7	28S1-DV28S1		TGGTTGTGCACGAGCGAGACACTG	
37	AV37				
38	AV38-1	14S2		CCCAGCAGGCAGATGATTCTCGTT	
	AV38-2/DV7	14S1-ADV14S1			
39	AV39	27S1		AAGCCCGTCTCAGCACCCCTCCACA	
40	AV40	31S1			
41	AV41	19S1		ACACTGGCTGCAACAGCATCCAGG	
TRCA				GTTGCTCCAGGCCGCGCACTGTT	

**Tabla III:** Cebadores utilizados para determinar 29 subfamilias V $\alpha$ .

1) TRVA1 correspondiente a el TCRV $\alpha$ 7.2 de la antigua nomenclatura, dentro de los cuales se encuentran poblaciones (TCRV $\alpha$ 7.2 TRJA33) que reconocen la molécula tipo clase 1, MR1, 2) Las poblaciones NKT, que reconocen CD1d, utilizan el segmento TRVA10-TRJA18 (anteriormente TCRV $\alpha$ 24-JQ) y 3) Región variable expandida en una de las biopsias analizadas (EC21).

Subgrupo	TRBV	Nomenclatura antigua	T (nt)	F	PRIMER Bragado, et al (209)
1	BV1				
2	BV2	22S1			
3	BV3-1 BV3-2	9S1 9S2			GAACAAAATCTGGGCCATGATACT
4	BV4-1 BV4-2 BV4-3	7S1 7S3 7S2			CAACATATGGGGCACAGGGCAATG
5	BV5-1 BV5-2 BV5-3 BV5-4 BV5-5 BV5-6 BV5-7 BV5-8	5S1 5S5 5S6 5S3 5S2 5S7 5S8			CTGATCAAAACGAGAGGACAGCA
6	BV6-1 BV6-2 BV6-3 BV6-4 BV6-5 BV6-6 BV6-7 BV6-8 BV6-9	13S3 13S2a 13S2b 13S5 13S1 13S6 13S8 13S7 13S4			GCATGACACTGCAGTGTGCC ** AGGCCTGAGGGATCCGTCTC
7	BV7-1 BV7-2 BV7-3 BV7-4 BV7-5 BV7-6 BV7-7 BV7-8 BV7-9	6S10 6S7 6S1 6S11 6S12 6S4 6S14 6S3 6S5			TCAGGTGTGATCCAATTC
8	BV8-1 BV8-2				
9	BV9	1S1			TCCCCTAGGTCTGGAGACCTCTCT
10	BV10-1 BV10-2 BV10-3	12S4 12S3 12S2			''''''???'¿¿¿
11	BV11-1 BV11-2 BV11-3	21S1 21S3 21S4			
12	BV12-1 BV12-2 BV12-3 BV12-4 BV12-5	8S4 8S5 8S1 8S2 8S3			GAGGTGACAGAGATGGGACA
13	BV13	23S1			
14	BV14	16S1			GACCCAATTTCTGGACATGATAAT
15	BV15	24S1			
16	BV16	25S1			
17	BV17	26S1			
18	BV18	18S1			AGCCCAATGAAAGGACACAGTCAT
19	BV19	17S1			GAACAGAATTTGAACACGATGCC
20	BV20-1	2S1			TTTCAGGCCACAACATATGTTTG
21	BV21-1	10S1			GTTCCTATAAAAGCACATAGTTAT
22					
23	BV23-1	19S1			ACCCCGAAAAAGGACATACTTTT
24	BV24-1	15S1			TCTCAGACTAAGGTTCATGATAGA
25	BV25-1	11S1			TCTCAAACCATGGGCCATGACAAA
26	BV26				
27	BV27	14S1			ACCCAAGATACCTCATCACAG
28	BV28	3S1			GATATGGACCATGAAAAATGTTT
29	BV29-1	4S1			ACGATCCAGTGTCAAGTCGA
30	BV30	20S1			GAGGGAACATCAAACCCCAACCTA
TRBC1-2					TTTGGGTGTGGGAGATCTC

**Tabla IV:** Cebadores utilizados para determinar 20 subfamilias V $\beta$ .

REACTIVOS	[ ] Inicial	[ ] final	ul/tubos
Buffer BRL	5 X	1 X	4
DTT	0.1 M	5 mM	2
Script II			1
RNA sin			0.5
d NTP	10 mM	0.5 mM	1
(20) oligo dTTPs	27 uM	0.67 uM	0.5
H2O			1
<b>PARCIAL</b>			<b>10</b>
RNA		2 ug (*)	x
H2O DEPC			x
<b>TOTAL</b>			<b>20</b>

**Tabla V:** Reactivos para la reacción de Retrotranscripción.

### 6.2.5 Protocolo asociado: Diseño de cebadores

Para el diseño de cebadores, se tuvieron en cuenta los criterios de:

(1) Formación de híbridos estables con la secuencia diana (estabilidad interna de la unión). Para esto se considera la entalpía o ( $\Delta G$ ) de la región terminal 3'. A mayor valor absoluto de la entalpía, más estable es la formación del dúplex, y menos eficiente resultará la PCR. Este cálculo es más simple que el de la  $T_m$ . (2) Formación de dímeros terminales. La formación de dímeros en la región 3' reduce el rendimiento de la reacción. Cuanto menor sea la longitud del cebador se reduce la probabilidad de formación de dímeros y estructuras secundarias. (3) La formación de estructuras secundarias como un "harping loop", puede iniciar una polimerización interna del cebador. (4) La  $T_h$  de hibridación (aprox=  $T_{melting} + 10^\circ C$ ). Cuanto más alta es, más restrictiva será la unión. Es importante que la  $T_m$  del producto a amplificar y la del cebador sean lo más similar posible. (5) El cebador debe ser específico del gen producto que deseamos amplificar. Los cebadores se diseñaron con el programa informático Oligo 4.0 (National Biosciences Inc, Plymouth, MN, USA). La homología de un cebador con otras secuencias no deseadas, se determinó utilizando el motor de búsqueda del EBI (European Bioinformatics Institute) Home page ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)), FASTA3. La base de datos utilizada fue la del EMBL.

### 6.2.6 Protocolo asociado: Cuantificación de cebadores

La fórmula para determinar la concentración de un cebador en  $\mu M$  es:  $[ ] \mu M = DO (260) \times Dilución \times \epsilon \mu M$ . Coeficiente Extinción microMolar ( $\epsilon \mu M$ ) =  $1000 / (14 (G+A) + 9 (C+T))$

### 6.2.7 Protocolo asociado: Cálculo de la $T_m$

Cálculo de la  $T_m = [ 16,6 \times \log (M) + 0.41 \times \% G/C + 81.5 - 675/L ]$

L: Longitud de la sonda; M: (A+C)

### 6.3 Protocolo Básico: Análisis de los receptores NK

La presencia de mRNA codificante para los receptores NK se realizó mediante PCR. Cada ciclo de amplificación comprendió 30 seg a 94 °C, 30 seg de unión a 60 °C (NKG2A/C) o 54 °C (CD94) y 30 seg de extensión a 72 °C. Los cebadores para la amplificación de NKG2A, se diseñaron con el programa informático Oligo 4.0. Las secuencias de los cebadores para NKG2C y CD94 fueron provistas por el Prof. López-Botet. La cebadores utilizadas figuran en la **tabla VI**. Los productos amplificados fueron corridos en una electroforesis de agarosa 2%, visualizados en UV y fotografiados.

Gen	cebadores	Sequence (5' to 3')	T <sup>a</sup> Annealing	Amplimer
NKG2A/B	sense	TGCCCCCAAACCCAAAGA	60°C	NKG2A: 403 NKG2B: 349
	a-sense	CAGGCCAGCAAACCTCTCTTC		
NKG2C	sense	ATGAGTAAACAAAGAGGAACCTTC	60°C	697
	a-sense	CTCTAAAGCTTATGCTTACAATGAT		
NKG2D	sense	TTCGTGGTCGGAGGTCTCT	64°C	393
	a-sense	GAAGGCTGGCATT'TTGAG		
CD94	sense	TCTGACTGCTGTTCTTGCCAAG	54°C	217
	a-sense	GGTGTGCTCCTCACTGTAAGA		

**Tabla VI:** Cebadores receptores NK

### 6.4 Protocolo Básico: Amplificación de citoquinas por PCR en Tiempo Real

La amplificación en Tiempo Real permite la cuantificación de un cDNA a través de la comparación de ciclos de inicio de fluorescencias entre el amplímero generado a partir de este producto con la fluorescencia de una curva patrón externa formada por amplímeros de concentraciones conocidas. Este proceso se realizó en un Termociclador Light Cycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). 10 ul de volumen final de reacción contenía: 1ul de cDNA, y una mezcla de LightCycler-DNA Master SYBR Green I (1ul), MgCl<sub>2</sub> (3mM), cebadores sentido y antisentido (0.5 uM) (**Tabla VII**) y H<sub>2</sub>O hasta completar los 10 ul.

Curvas Patrón: Las curvas patrón para CD3, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 se prepararon a partir de cDNA obtenido de PBL estimulados con PMA/Ionomicina. Los distintos productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de bajo punto de fusión (Nusive, BioWhittaker, Bruselas, Bélgica) y se purificaron en columnas de fibra de vidrio que retienen fragmentos de entre 0.1-10 kb (GFX PCR DNA and gel band purification kit, Amersham Biosciencias) del gel. Luego de cuantificarlo se realizaron diluciones seriadas al décimo en tampón TE (10mM Tris-HCl:1mM EDTA pH7.5) desde 10<sup>1</sup> a 10<sup>7</sup> copias. Los estándares se congelaron a -20 °C hasta su uso.

Es conveniente realizar nuevas diluciones a partir del estándar de mayor número de copias antes de cada amplificación. Los protocolos de amplificación están en la **tabla VIII**.

Gen	cebadores	secuencia (5' to 3')	T <sup>a</sup> unión	Amplimero
GAPDH	sense	TCTTCTTTTTCGTCGCCAG	63	372
	a-sense	GGGGGCAGAGATGATGACC		
CD3- $\delta$	sense	CTGGACCTGGGAAAACGCATC	65	
	a-sense	GTACTGAGCATCATCTCGATC		
IFN- $\gamma$	sense	TGGGTTCTCTTGGCTGTTAC	62	470
	a-sense	CAGGCAGGACAACCATTACT		
IL-4	sense	ACTGCTTCCCCCTCTGTTCT	60	375
	a-sense	CTCTGGTTGGCTTCCTTCAC		
IL-10	sense	CAGGGCACCCAGTCTGAGAA	62	328
	a-sense	CCCCAGGGAGTTCACATGC		

**Tabla VII:** Cebadores utilizados para la PCR en Tiempo Real. Los cebadores fueron diseñados utilizando el programa informático Oligo 4.0.

	Preincubación		Amplificación						Curva Melting	
	temp	time	Seg 1	time	Seg 2	time	Seg 3	time	Slope	Temp
	°C	sec	°C	sec	°C	sec	°C	sec	(°C/sec)	°C
CD3- $\gamma$	95	600	94	10	65	10	72	12	0.05	75-95
IFN- $\gamma$	95	600	94	10	62	10	72	19	0.05	72-95
IL-4	95	600	94	10	60	10	72	15	0.05	70-95
IL-10	95	600	94	10	62	10	72	12	0.05	72-95

**Tabla VIII:** Protocolo PCR en Tiempo Real.

#### 6.4.1 Protocolo alternativo: Amplificación de citoquinas por PCR

En algunos casos (Titulación Tiempo óptimo de expresión de citoquinas) se realizó una PCR convencional. Los cebadores utilizados son distintos a los utilizados para PCR en Tiempo Real (**tabla IX**). Las condiciones de amplificación fueron:

IFN- $\gamma$ : 95°C-45"/ 60°C-45"/ 72°C-60"/ 40 ciclos extensión 72° 7 min;

IL-4: 95°C-45"/ 60°C-45"/ 72°-60"/ 40 ciclos extensión 72° 7 min;

IL-10: 95°C-45"/ 60°C-45"/ 72°-60"/ 35 ciclos extensión 72° 7 min

Gen	Cebadores	Secuencia (5' to 3')	T <sup>a</sup> Annealing	Tamaño (nt)
CD3- $\delta$	sense	CTGGACCTGGGAAAACGCATC		
	a-sense	GTACTGAGCATCATCTCGATC		
IFN- $\gamma$	sense	ATGAAATATACAAGTTATATCTTGGCTTT	52,7	501
	a-sense	TTACTGGGATGCTCTTCGACCTTGAACAGCAT		
IL-4	sense	ATGGGTCTCACCTCCCAACTGCT	57,1	456
	a-sense	CGAACACTTTGAATATTTCTCTCAT		
IL-10	sense	AAGCTGAGAACCAAGCCCAGACATCAAGGCG	60,7	328
	a-sense	AGCTATCCCAGAGCCCAGATCCGATTTTGG		

**Tabla IX:** Cebadores utilizados para la curva de tiempo vs estímulo .

#### **6.4.2 Protocolo asociado: Estimulación con PMA/Ionomicina**

Las células T ( $1 \times 10^6$  células/ml) se estimularon con 25 ng/ml de PMA (Sigma) y un 1 ug/ml de Ionomycin (Sigma) durante 4 hr a 37 °C en 5% CO<sub>2</sub>.

#### **6.5 Protocolo Básico: Hibridación de mRNA para CD1 d**

Para el análisis de la transcripción de la molécula CD1d en distintas líneas celulares, 10 ug de RNA de distintas líneas celulares se corrieron en un gel 1 % de agarosa (1X de MOPS, 1% de formaldehído, en H<sub>2</sub>O DEPC). Las muestras corridas en el gel se transfirieron a una membrana de nylon (Hybond, Amersham Biosciencias) utilizando SSC (20 x). La transferencia se realizó durante toda la noche en dirección descendente, como consecuencia del paso del líquido (SSC 20x) atraído por capilaridad por un papel absorbente situado debajo de la membrana y del gel. La hibridación se realizó con un segmento completo del DNA correspondiente al codificante para la proteína CD1d marcado con dCTP<sup>32</sup>. La membrana se prehibridó durante 2 hs en un tubo de hibridación con 20 ml de una solución Church-Gilbert (211) (0.25 M de NaHPO<sub>4</sub>, 1% de BSA, 1mM EDTA, 7% SDS y H<sub>2</sub>O) dentro de un horno rotatorio a 68 °C. Pasado el tiempo de prehibridación se agrega la sonda marcada y desnaturalizada durante 3 min a 95 °C y enfriada en hielo. La hibridación se hizo a 42 °C durante toda la noche.

Lavados y exposición de la membrana. Los lavados se hicieron a 68 °C en solución 20 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mM de EDTA y 1% de SDS. La membrana se extiende sobre un soporte y se pone a contactar con un film de autoradiografía (Hyperfilm ECL: High performance Chemiluminiscence Film, Amersham Biosciencias)

#### **6.5.1 Protocolo asociado: Transformación bacteriana con pSR1aNEO-CD1d**

Se utilizaron bacterias DH5a competentes para la transformación por choque térmico. Doscientos ul de bacterias previamente descongeladas se mezclaron con 1 ul de DNA (plásmido más inserto). Secuencialmente se incubaron 30 min en hielo, 90 seg a 42 °C y nuevamente 1 min en hielo. A la reacción se agregó 800 ul de SOC (SOB + 20 mM de glucosa) y tras 1 hora en agitación a 37 °C se lavó con 2 ml de SOB (LB + 20 mM de MgSo<sub>4</sub>). Luego se resuspendió en 200 ul de SOB. Las bacterias transformadas se sembraron en agar LB + ampicilina (40 ug/ml) para su selección.

#### **6.5.2 Protocolo asociado: Purificación de plásmido (Megaprep)**

La purificación del plásmido se realizó con un sistema comercial (Magic™ Megapreps DNA purification System, Promega, Madison, WI, USA). Se partió de 500 ml de un cultivo de 16 hs de bacterias ( $DO_{600\text{nm}} > 1$ ) crecidas en agitación a 37 °C. El pellet se resuspendió en 30 ml de tampón (50mM TrisHCl, ph:7.5, 10 mM EDTA, 100 ug/ml RNAsa). Luego se agregó 30 ml de tampón de lisis (0.2 M NaOH, 1% SDS) y posteriormente se neutralizó con 30 ml de una solución de Acetato de Potasio (2.55M, PH: 4.8). Se centrifugó a 14,000 x g durante 15 min. El sobrenadante se pasó

a un tubo nuevo y se agregaron 0.6 vol de Isopropanol. Luego de invertir el tubo varias veces, se volvió a centrifugar (14.000 x g, 15min). El pellet se resuspendió en 3 ml de TE. Se obtuvieron 0.010 ug/ml de plásmido.

*Nota: Para marcar una sonda se usan 50 ng. Un ml de cultivo da aproximadamente 1 ug de plásmido. Para tener 500 ng de sonda, (1500 ng de plásmido), sería suficiente con crecer 2 ml de de bacterias y hacer un miniprep. Concentración plásmido= DO260 x 0.05 x dilución*

### **6.5.3 Protocolo asociado: Aislamiento del Inserto**

Una vez aislado el plásmido, se digirió con las enzimas de restricción BAM H1 y Xho (NewEngland Biolabs). Se digirió aproximadamente 1 µg de plasmido con 1-2 U de cada enzima. El digerido se sometió a electroforesis en gel 1,2 % agarosa. Se cortó la banda del inserto y se eluyó con el sistema QIAquick (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Ltd, Hilden, Alemania).

### **6.5.4 Protocolo asociado: Marcaje de un fragmento largo de DNA**

El fragmento aislado se marcó por random priming con dCTP<sup>32</sup> (Oligolabeling kit, Amersham Biosciencias). La reacción de marcaje se realizó en un volumen final de 50 ul ( 10 ul Reagent mix, 5 ul de dCTP<sup>32</sup> , H2O hasta 49 ul y 1 ul Klenow). El DNA se purificó por columna de Sephacryl (MicroSpin S-300, Amersham Biosciencias) para eliminar el <sup>32</sup>P no incorporado.

## **6.6 Protocolo Básico: Hibridación de DNA por DOT Blot con una sonda CDR3-V $\alpha$ 2**

El producto de PCR correspondiente al amplímero que se hibridó, se transfirió a una membrana Hybond+ (Amersham Biosciencias) a través de un sistema de vacío. Para esto se diluyeron entre 0-8 ug de DNA en 200 ul de Tampón de Dot Blot. Esta solución se agregó en el sistema de DOT BLOT, donde por vacío el material queda retenido en la membrana. La membrana es previamente humedecida con el tampón, para comprobar que no haya pérdidas de líquido. Las muestras se colocan en cada pocillo y se dejan durante de 15 a 30 min. Luego se aplicó el vacío y se lavó con el tampón. La membrana se desmontó del aparato y se dejó 5 min en solución de desnaturalización (en agitación). Pasar a una solución de neutralización en agitación hasta obtener un pH de 7.5-8.0. El DNA se entrecruza ("crosslinking") a la membrana con UV (UV, Stratilinker 1800, Stratagene, La Jolla, CA, USA). La membrana se guardó entre papeles Whatmann en lugar seco o a - 20° hasta el momento de hibridar.

### **6.6.1 Protocolo asociado: Hibridación con sonda**

Preparar las membranas y hacer stock de trabajo de la sonda a 20 µM. Colocar la membrana con 10 ml de solución de prehibridación durante un mínimo de 1h a la Th (mejor bloquear o/n) a velocidad lenta en un horno rotatorio (Hybridization Oven/Shaker, Amersham Biosciencias). Pasado el tiempo de pre-hibridación, se añadieron 1x10<sup>6</sup> cpm de la sonda marcada por ml de solución de hibridación. Las membranas se incubaron 2 hs y se lavaron durante 25 min con SSC 2X,

1% SDS a T ambiente y 25 min a Th. Las membranas se revelaron en placas radiográficas (Kodak).

*Nota: Cálculo de la Th (T Hibridización):  $T_m - 10\text{ }^\circ\text{C}$*

### **6.6.2 Protocolo asociado: Marcaje sonda**

Se marcó la sonda (20  $\mu\text{M}$ ) con [ $^{32}\text{P}$ ] ATP en el extremo 5' con la T4 polinucleótido Kinasa que cataliza la transferencia de un P  $\gamma$  de un ATP al hidroxilo del extremo 5' (T4 Polynucleotide Kinase, New England Biolabs, Herdfordshire, Inglaterra). El volumen final de la reacción de marcaje es de 20  $\mu\text{l}$ . Luego de 1 hr la reacción se frenó con 30  $\mu\text{l}$  de EDTA 0.01M. La sonda (50  $\mu\text{l}$ ) se purificó en columnas de Sephadex G25 (MicroSpin G25 columns, Amershan Biosciences). La radioactividad se midió en un contador Microbeta (Wallac).

Las sondas utilizadas fueron:

Sonda CDR3 TCRV $\alpha$ 2 (clon EC21.21) = 5'-AGGTTGTTTGCCCCAGCCCG-3'

Sonda TCR C alfa = 5'-GTCAGTGGATTAGAGTCT-3'

*Nota: Solución de pre/hibridación (10 ml): 1 ml SSC 20x (2x), 1ml Denhardt's 50x (5x), 500  $\mu\text{l}$  SDS 20% (1%), 7.5 ml de H<sub>2</sub>O y 150  $\mu\text{l}$  sssDNA (Esperma de Salmón)*

## 6.7 Soluciones

Solución	Reactivos
<b>GSA</b>	23.6g Isotiocianato de guanidina (CH <sub>5</sub> N <sub>3</sub> HSCN), 2.5ml Acetato sódico ph:4.0 y 2.5ml <i>Sarcosil</i> 10%
<b>Acetato sódico</b> ph: 4.0 (50ml)	6.8g AcNa, 10ml Acético glacial, enrasar con H <sub>2</sub> O. <i>Homogenizar el AcNa con vortex.Tener cuidado cuando agregamos el H<sub>2</sub>O porque a medida que el AgNa se disuelve aumenta de volumen-Reacción endotérmica</i>
<b>Gel de Agarosa</b>	TAE 1X, BrEt (0,50ug/ml), Agarosa
<b>Loading buffer (10 ml)</b>	Azul de Bromofenol (0,025g), Ficoll (2,5g), Xilene Cinanol ( 0,025g). Hacer vortex para disolver el ficoll.
<b>Buffer siembra RNA</b>	7.5 ul (5 ul Formamida, 1,5 ul Formaldehido, 1 ul MOPS (1x). Se agrega a 2.5 ul de RNA. Desnaturalizar 5 min a 65 °C y poner en hielo. Luego agregar 2 ul Loading buffer y 0.2 ul BrET.
<b>TAE 20X ( 1L)</b>	Tris base (96,8g), Ac Acético glacial (22,84g ), EDTA 05,M ph:8 ( 40ml)
<b>1X de MOPS</b>	0.2 M MOPS, 50 mM acetato de Na pH 7, 7 mM EDTA
<b>Buffer DOT BLOT</b> <b>(300 ml)</b>	6ml EDTA 0.5 M pH 8 (10mM), 150 ml PBS20x (10X)y 144 ml H <sub>2</sub> O.
<b>SSC 20X (1lt)</b>	175,3 g NaCl (3M), 88,2 g Tri Na-Citrato (0.3 M), llevar a 1 L ajustando previamente el pH a 7 con HCl.
<b>EDTA 0.5 M (ph:8.0)</b>	PM: 372,24 EDTA Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O (93 g) y NaOH (10 g) y H <sub>2</sub> O 500 ml
<b>Tris -Cl 1M (pH: 8.0)</b>	Tris 60,57 g + 500 ml H <sub>2</sub> O
<b>Epps 0.1 M (pH:8.2)</b>	PM=252,3 (2,523g/ 100 ml).
<b>Epps-EDTA</b> <b>E:E 10:0.1</b>	25 ml Epps (0.1M), 14.3 ml NaOH (0.1N), 50 ul EDTA (0.5M, pH:8). Completar con H <sub>2</sub> O. Vf=250 ml
<b>Sol. Desnaturalización</b>	(250 ml)12.5 ml NaOH 10N (0.5 N),75 ml de NaCl 5 M ( 1.5 M) y 162.5 ml H <sub>2</sub> O
<b>Sol. neutralización</b> <b>(300 ml):</b>	150 ml Na Cl 3M (1.5 M), 150 ml Tris pH 7.2 1 M (0.5 M) y 0,6 ml EDTA 0.5 M pH 8 (0,001 M)
<b>Sol. pre/hibridación</b> <b>(200 ml)</b>	20 ml PBS 20x ( 2x), 2 gr Bloq.Reagent (1%), 571 µl, Sarcosil 35% (0.1%), 200 µl SDS 20% (0.02%) y H <sub>2</sub> O Disolver bien antes de utilizar ( si es necesario calentar a 60-65°, 1h).
Church-Gilbert (dot blot)	0.25 M de NaHPO <sub>4</sub> , 1% de BSA, 1mM EDTA, 7% SDS y H <sub>2</sub> O

*Resultados*

---



## PRÓLOGO

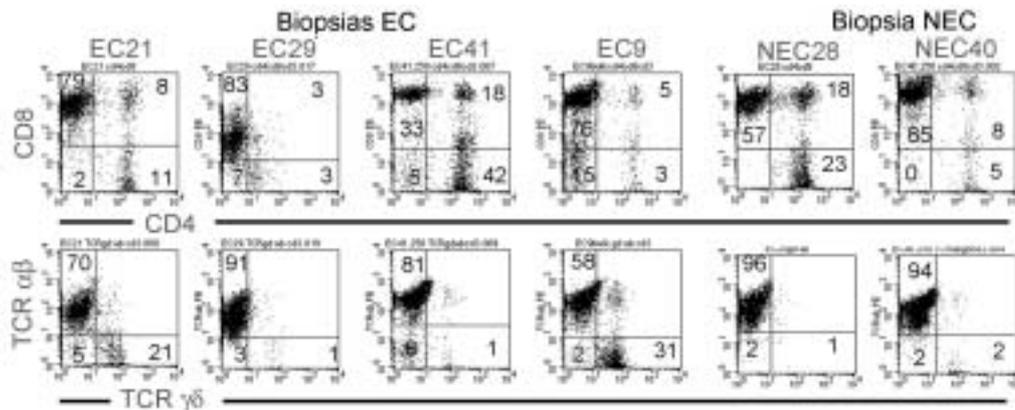
### *FENOTIPO DE LOS LINFOCITOS T EN BIOPSIAS DE MUCOSA INTESTINAL*

Hemos aislado y expandido linfocitos T de biopsias de intestino delgado de niños con sospecha de enfermedad celíaca. Las biopsias se obtuvieron todas del Hospital pediátrico Pedro Garrahan de Buenos Aires con la colaboración de la Dra Susana De Rosa mediante el uso de cápsulas Crosby-Kruger de doble boca. Una de las muestras se puso en medio de cultivo para su transporte y posterior procesamiento en el laboratorio de cultivo celular y la otra para su diagnóstico en anatomía patológica. Para el estudio de las poblaciones linfocitarias de estas biopsias, se aislaron los linfocitos del tejido, partiéndose siempre de material fresco y se utilizaron métodos de disgregación mecánica comunes para otros tipos de tejido. En este trabajo se presentan resultados del cultivo de siete biopsias, todas provenientes de niños de entre 4 y 12 años (**Tabla 0.1**). Cuatro de las muestras de tejido duodenal, provienen de pacientes a los que se les diagnosticó Enfermedad Celíaca (EC) y tres de pacientes sin patología inflamatoria (No Celíacos, NEC).

El fenotipo de la población total de linfocitos T aislados en 4 biopsias EC y en 2 NEC se muestra en la **Figura 0.1**.

Biopsia	Edad	Grado	Sexo	DQB1*	DRB1*
NEC 44	6 años	Normal	M	0201, 0603	03,13
NEC 40	7 años	Normal	F	0202, 0302	07,08
NEC 28	12 años	Normal	M		
EC 9	4 años	III	F		
EC 21	6 años	IV	M	0202, 0301	07,12
EC 29	15 meses	IV	M		
EC 41	10 años	IV	F	0302	04

Tabla 0.1



**Figura 0.1:** Fenotipo de las poblaciones de células T aisladas de 6 biopsias (4 EC y 2 NEC). Expresión en superficie de los receptores TCR $\alpha\beta/\gamma\delta$  y de los correceptores CD4/CD8.

### *Clonación de las células T de biopsias intestinales. Estudio de las diferentes poblaciones*

Las células obtenidas de cuatro biopsias EC (EC9, EC21, EC29, EC41) se clonaron por dilución límite a 5, 2.5, 1.25, 0.6 y 0.3 células por pocillo. Se obtuvieron un total de 256 clones estadísticos. De las biopsias no patológicas (NEC40, NEC44 y NEC28), se clonaron las células aisladas de las dos primeras, obteniéndose un total de 48 y 20 clones respectivamente. La **Tabla 0.2** resume el fenotipo de los clones obtenidos.

Si bien algunos clones CD4<sup>+</sup> se analizaron por su reactividad y secreción de citoquinas, en experimentos control, los estudios específicos que se presentan en este trabajo son sobre las poblaciones TCR  $\alpha\beta^+$  CD8<sup>+</sup> y las TCR  $\gamma\delta$ .

	CD4	CD8	$\gamma\delta$	DP	Mixtos	Total
<b>NEC 44</b>	16	1	-	-	3	<b>20</b>
<b>NEC 40</b>	5	34	2	-	7	<b>48</b>
<b>NEC 28</b>	-	-	-	-	-	-
<b>EC 9</b>	7	44	19	-	9	<b>80</b>
<b>EC 21</b>	8	42	-	-	6	<b>56</b>
<b>EC 29</b>	24	31	5	-	12	<b>72</b>
<b>EC 41</b>	33	6	1	1	7	<b>48</b>

**Tabla 0.2:** Fenotipo de los clones obtenidos de las distintas biopsias Celíacas (EC) y controles (NEC).

El trabajo consta de 4 capítulos, en cada uno de los cuales se estudiaron células de un determinado fenotipo. En el primero de ellos se define un clon CD8 con fenotipo de IEL clásico ( $TCR\alpha\beta$ ,  $CD8^+$ ,  $CD103^+$ ), aislado de la biopsia no celíaca NEC44. (*NEC44.25: IEL con reactividad epitelial*), que nos permitió caracterizar esta población.

El segundo capítulo: "*IELs  $TCR\alpha\beta$   $CD8^+$* " es un estudio comparativo funcional entre los IELs  $CD8^+$   $TCR\alpha\beta$  aislados de biopsias procedentes de celíacos y no celíacos: 2 EC (EC9 y EC41) y una NEC (NEC40).

El tercer capítulo, "*Expansión de una población  $CD8^+$   $V\alpha 2.3$  productor de IL-4*", es un estudio genético y funcional de una población de células  $CD8^+$  de Lámina Propia ( $CD8^+CD103^-$ ), aisladas de una biopsia celíaca (EC21).

El cuarto capítulo: "*IELs  $\gamma\delta$  en Enfermedad Celíaca*", es un estudio funcional de la población  $\gamma\delta$  claramente incrementada en el epitelio de la mucosa celíaca. El mayor número de células  $\gamma\delta$  se aisló de la biopsia EC9.

A continuación de cada capítulo se presenta una discusión de los resultados y al final del trabajo una discusión general y las conclusiones.

## *Capítulo I*

*NEC44.25: IEL con reactividad epitelial*

---

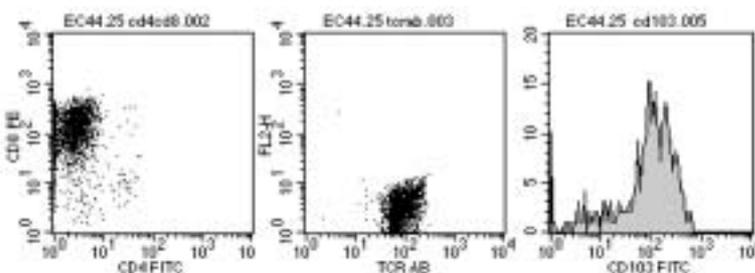


*Caracterización de un clon IEL TCR $\alpha\beta$ , CD8<sup>+</sup> y CD103<sup>+</sup> aislado de una biopsia de mucosa intestinal sin patología aparente*

### 1.1 Aislamiento de un clon con fenotipo IEL de una biopsia no celíaca

El primer clon que se estudió procedía del cultivo durante 48 hs de una biopsia intestinal sin patología aparente (NEC44), del que se obtuvo un total de 40.000 células viables. Las células se sembraron en placas a 100 células/pocillo y se estimularon con PHA-L y PBLs autólogos irradiados. Tres días después se agregó rIL-2 (20 U/ml) y se mantuvieron los cultivos mediante reestimulación en las mismas condiciones cada 7 o 10 días, sólo que usando como células feeders una mezcla 1:10 de LCL autólogas (CEB44) y PBL alogénicos irradiados.

A pesar del alto número de células sembradas, sólo se obtuvieron 20 líneas oligoclonales de linfocitos T, es decir que el número de células expandidas fue muy limitado. El análisis por citometría de flujo determinó un total de 16 líneas CD4<sup>+</sup>, tres líneas mixtas CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, y sólo una línea CD8<sup>+</sup> (NEC44.25) (**figura 1.1**). Todas expresaban el TCR  $\alpha\beta$ . La expresión de CD103 (cadena  $\alpha_E$  del heterodímero que forma la integrina  $\alpha_E\beta_7$ ) en NEC44.25 confirmó el origen intraepitelial de esta línea (que más tarde se demostró clonal), por lo que se seleccionó para su posterior estudio funcional. El clon NEC44.25 mantuvo siempre un alto nivel de crecimiento, siendo necesario para su proliferación la adición de IL-2 cada 72 hs y reestimulación cada 14 días. Los ensayos se realizaron entre el sexto y décimo días postestimulación. Se tienen criopreservados aproximadamente 170 viales con una media superior al millón de células por criotubo.

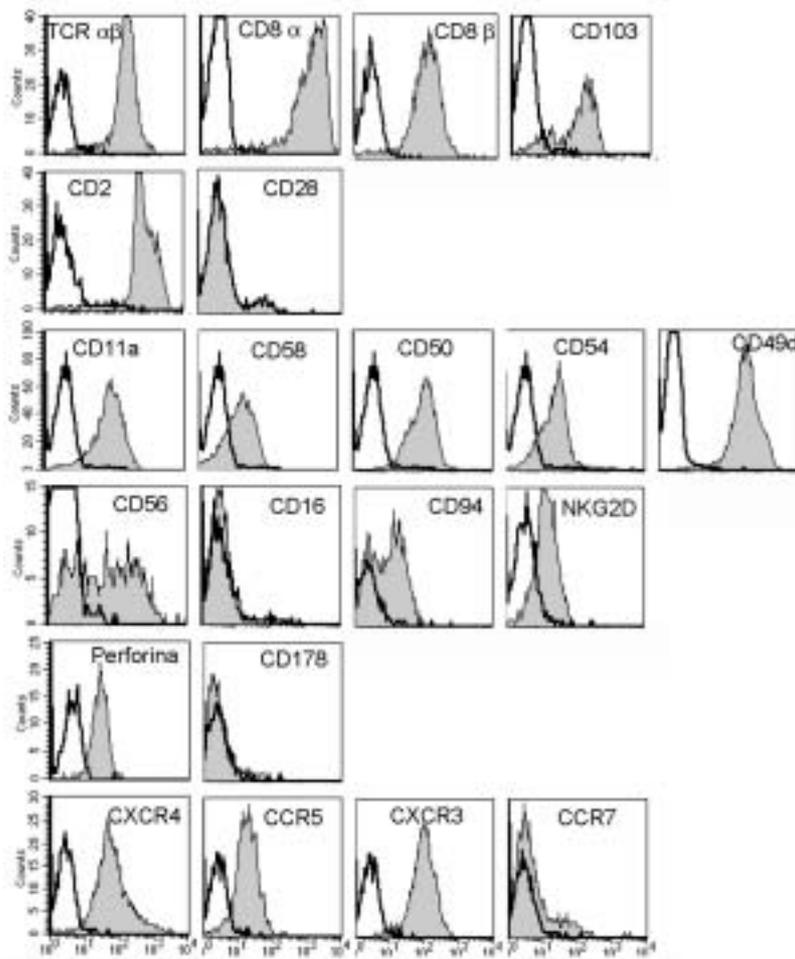


**Figura 1.1:** Fenotipo Intraepitelial del clon NEC44.25. La expresión de CD103 junto al correceptor CD8, indica el origen intraepitelial del clon NEC44.25.

### 1.2 Otros marcadores celulares del clon NEC44.25

La **figura 1.2** muestra el fenotipo de la línea NEC44.25, que expresó CD2, CD8 y el TCR  $\alpha\beta$ . Según el perfil clásico de los IELs, no expresó el receptor coestimulador CD28. Además de la integrina  $\alpha_E$ (CD103) $\beta_7$ , NEC44.25 expresó las moléculas de adhesión CD11a, CD58, CD54, CD49d y CD50, así como el marcador de células NK CD56, pero no el receptor de baja afinidad para Igs, CD16, otro marcador común de células NK. CD94 y NKG2D también se expresaban en la superficie de estas células. Su potencial citotóxico quedó demostrado por la presencia de perforina en citoplasma, a pesar de la ausencia de CD95L (CD178). En cuanto a receptores de quimiocinas,

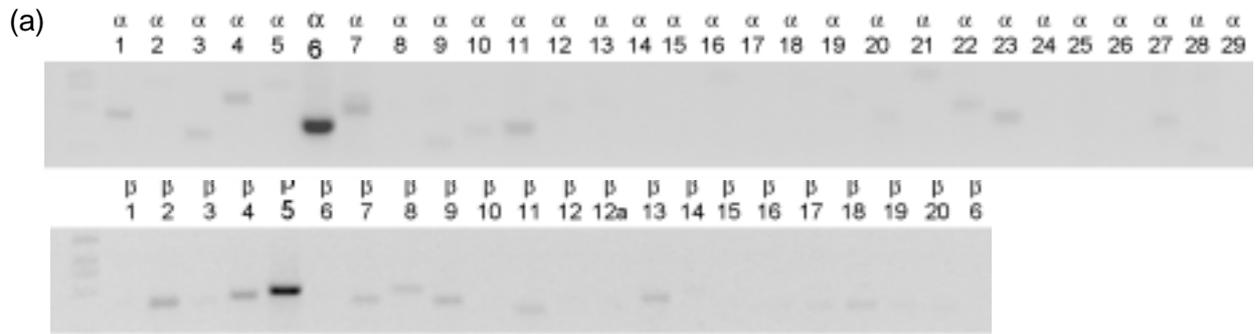
NEC44.25 fue positivo para CXCR4, CCR5 y CXCR3 y negativo para el receptor de memoria central CCR7.



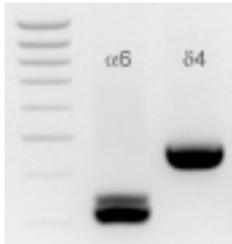
**Figura 1.2:** Fenotipo del clon NEC44.25. Aparte del receptor, correceptores y CD103, el resto de los marcadores celulares están agrupados en moléculas coestimuladoras (CD2, CD28), moléculas de adhesión (CD11a, CD58, CD54, CD49e y CD50), marcadores (CD16, CD56) y receptores NK (CD94 y NKG2D), moléculas efectoras (perforina y CD178) y receptores de quimiocinas (CXCR4, CCR5, CXCR3 y CCR7). El clon es negativo para CD28, CD16, CD178 y CCR7.

### 1.3 Análisis del TCR

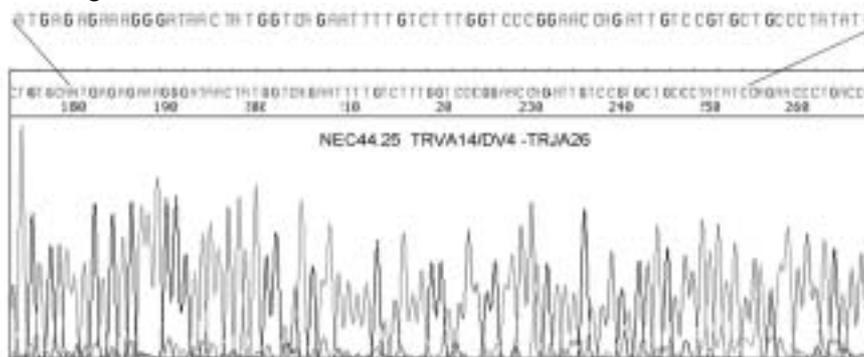
La clonalidad de la población se determinó por análisis de los segmentos variables de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR. La amplificación de las regiones TCRAV y TCRBV revelaron que NEC44.25 expresaba un solo segmento variable de  $\alpha$  y de  $\beta$ , correspondientes a las familias V $\alpha$ 6 y V $\beta$ 5, según la nomenclatura antigua, TCRAV14/DV4 y TCRBV5 de la nueva nomenclatura (**figura 1.3a**). Es interesante remarcar que el segmento TCRAV14 utilizado también puede asociarse al segmento delta constante con el nombre de TCRDV4, tal como se demuestra en la amplificación del DNA del receptor, utilizando un primer específico de esta familia variable delta (**figura 1.3b**). La secuencia de la región CDR3 TCRAV14/DV4 (**figura 1.3c**) indicó que la cadena V $\alpha$  reordena el segmento TRVJ26 y adiciona 4 nt en la zona CDR3 de diversidad. Es interesante notar que la cadena V $\beta$ 5 es de las regiones más representadas tanto en mucosas control como en celíacas (164).



(b) Amplificación con dos cebadores diferentes (TCRVα6 y TCRVδ4)



(c) Cromatografía de la secuencia



(d) **CDR3** del clon NEC44.25 **Vα6** (TCRVA14/VD4-TRJ26-TRCA) :

gaA AGG GAT AAC TAT GGT CAG AAT TTT GTC TTT GGT CCC GGA ACC AGA TTG TCC GTG CTG CCC TAT ATC  
 E R D N Y G Q N F V F **G** P **G** T R L S V L P Y I

(e) Secuencia completa de la cadena Vα.

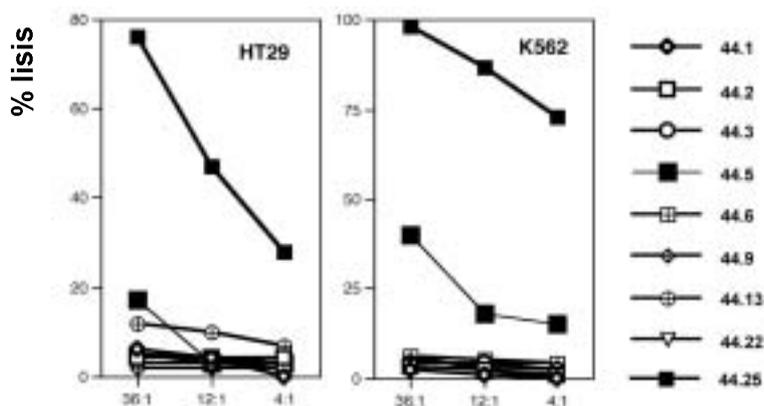
ATGTCACCTT CTAGCCTGCT GAAGGTGGTC ACAGCTTCAC TGTGGCTAGG TTCCTTCAG GACCTGGCAT TGCCAGAAG  
 ATAAC TCAA CCACACAGA ATGTTCTGTC AGGAAAAGGA GGCTGTGACT CTGGACTGCA CATAT**GACAC CAGTGATCCA**  
**AGTTATGGTC** TATCTGGTA CAAGCAGCCC AGCAGTGGGG AAATGATTTT TCTTATTTAT CAGGGGTCTT ATGACCAGCA  
 AAATGCAACA GAAGGTCGCT ACTCATTGAA TTCCAGAAG GCAAGAAAAT CCGCCAACCT TGTCATCTCC GCTTCACAAC  
 TGGGGGACTC AGCAATGTAC TTCTGTGCAA TGAGAGAAAG GGATACTAT GGTCAGAATT TTGTCTTTGG TCCCAGAAC  
 AGATGTCCG TGCTGCCCTA TATCCAGAAC CCTGACCCTG CCGTGTACCA GCTGAGAGAC TCTAAATCCA GTGACAAGTC  
 TGTCTGCCTA TTCACCGATT TTGATTCTCA AACAAATGTG TCACAAAGTA AGGATTCTGA TGTGTATATC ACAGACAAAA  
 CTGTGCTAGA CATGAGGTCT ATGGACTTCA AGAGCA**ACAG TGCTGTGGCC TGGAGCAACA** AATCTGACTT TGCATGTGCA  
 AACGCCTTCA ACAACAGCAT TATCCAGAA GACACCTTCTTCC

**Figura 1.3:** Análisis del TCR. (a) Determinación de las cadenas Vα y Vβ mediante PCR. La figura es la imagen invertida de un gel de BrEt donde se observan las amplificaciones correspondientes del TCRAV y del TCRBV. El clon utiliza los segmentos Vα6 y Vβ5. La expresión de otras bandas de menor intensidad se deben a contaminantes provenientes de los PBL utilizados como feeders para la estimulación del clon. b) Amplificación de la región Vα6 utilizando dos cebadores diferentes: la secuencia del primer utilizado para las amplificaciones de TRVD4 está en una posición más hacia el extremo 5' que el de TRVA6, generando un amplímero de mayor longitud (c) Resultado de la cromatografía en capilar del CDR3. (d) El CDR3 reordena el segmento TRJA26 y adiciona 4 nt. Las G resaltadas corresponden a Glicinas consenso de las regiones TRJA. (e) Secuencia completa del TCR Vα. La secuencia resaltada corresponde a la de los cebadores utilizados para la amplificación.

### 1.4 Reactividad sobre distintos tipos celulares

La población de linfocitos intraepiteliales asociados a la mucosa intestinal está presumiblemente involucrada en el reconocimiento de señales de estrés o de daño epitelial. Se utilizaron pues líneas epiteliales derivadas de tumores de epitelio intestinal como dianas celulares para caracterizar la actividad funcional del NEC44.25, partiendo de la premisa de que éstas pudieran expresar antígenos específicos del epitelio normal o antígenos que se expresen en situación de estrés.

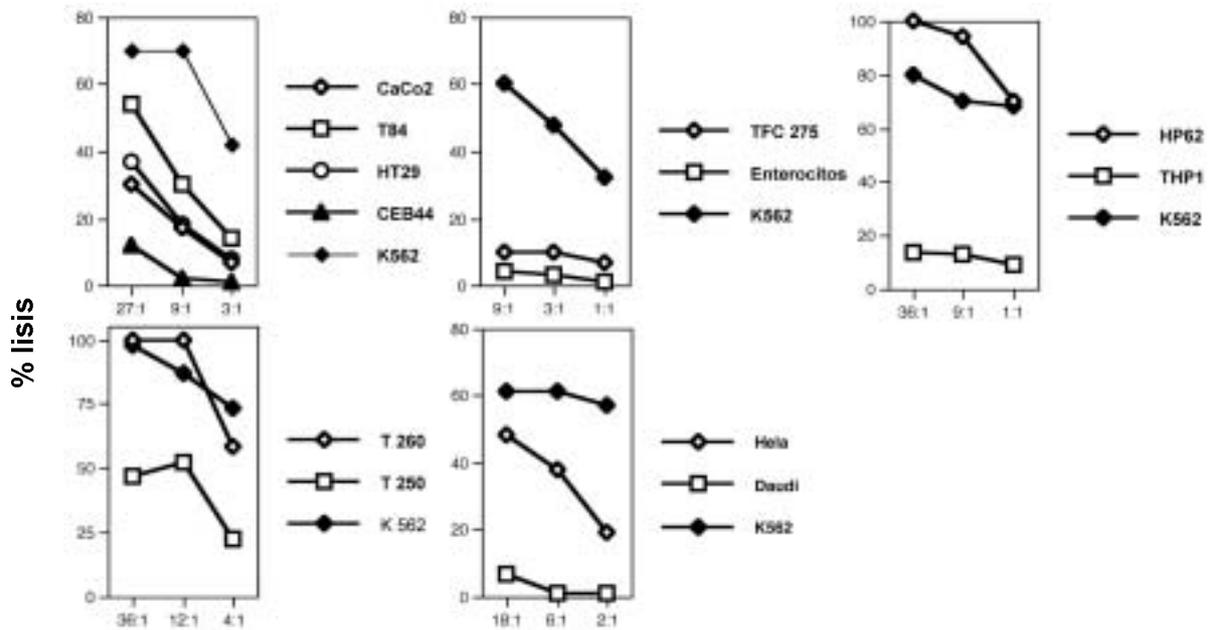
Se ensayó la actividad citotóxica del NEC44.25 contra la línea celular HT29 y la diana de células NK (K562) usando un protocolo standard de 4 horas de liberación de <sup>51</sup>Cr. La **figura 1.4** muestra el reconocimiento de la línea HT29 por el clon CD8<sup>+</sup> y no por los clones CD4<sup>+</sup> procedentes de la misma biopsia. Además de esta actividad específica, NEC44.25 mostró citotoxicidad de tipo NK, reflejada por la lisis de K562. Sólo uno de los clones CD4<sup>+</sup> (NEC44.5) mostró una actividad de tipo NK de bajo nivel, frente a K562, utilizando una relación efectora:diana muy elevada.



**Figura 1.4:** Comparación de la actividad citotóxica de las líneas obtenidas de NEC44 frente a la línea epitelial HT29 y la línea K562. Sólo NEC44.25 (CD8<sup>+</sup>) mostró actividad citotóxica frente a la línea epitelial, mientras que ninguna de las CD4<sup>+</sup> lo hizo. La diana específica de NK (K562) fue reconocida igualmente por NEC44.25 y a menor nivel por una de las líneas CD4<sup>+</sup> (NEC44.5).

Para definir la especificidad del clon NEC44.25 se realizó un estudio con diversas dianas celulares entre las que se incluyeron células de origen epitelial, de cultivos primarios (enterocitos y células foliculares de tiroides –CFT- TB250, TB260, TB275) y líneas establecidas a partir de tumores de epitelio intestinal (Caco2, HT29, T84), de cervix (Hela) y de páncreas (HP62). También se incluyeron células de origen hematopoyético, como líneas B linfoblásticas, LCL, (Daudi, EVB-alogénicas CEB21 y autólogas, CEB44), mieloides (THP1) y K562 como control positivo de citotoxicidad.

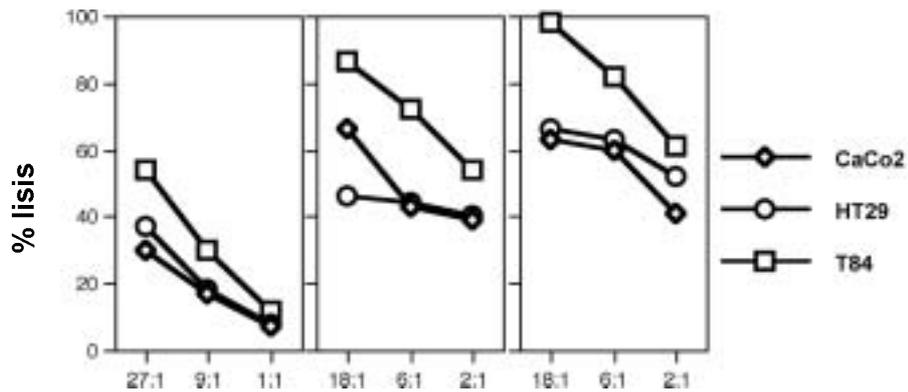
Se observó que NEC44.25 reconoce las líneas epiteliales derivadas de carcinoma de colon, Caco2, T84 y HT29. Lo mismo ocurre con las líneas epiteliales Hela y HP62. Respecto a células epiteliales primarias, se pudo observar la ausencia de lisis de enterocitos y células foliculares tiroideas provenientes de tiroides no autoinmunes (bocio multinodular, TB275). Es interesante destacar el reconocimiento de células epiteliales provenientes de dos tiroides afectados con enfermedad de Graves-Basedow (TB250 y TB260). Las LCL (Daudi, CEB44, CEB21) no fueron reconocidas por este clon, ni la línea mieloide THP1 (**figura 1.5**).



**Figura 1.5:** Reconocimiento de diversas dianas celulares por la línea NEC44.25. Además de la lisis de las líneas de carcinoma de colon (HT29, T84 y HT29), se observó que líneas celulares procedentes de otros epitelios (páncreas, HP62 o epitelio de cervix, HeLa) así como tirocitos primarios de pacientes con Graves-Basedow (T250 y TB260) fueron lisadas por el clon. Las LCL (CEB44, Daudi), mieloides (THP1), los cultivos primarios de enterocitos y las células foliculares tiroideas (TFC275) de un paciente no autoinmune (bocio multinodular), no fueron lisadas por el clon NEC44.25.

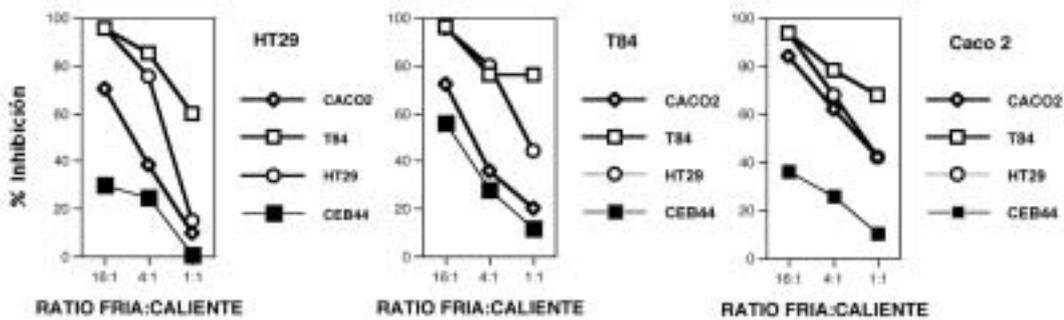
### 1.5 Reconocimiento de células epiteliales

A partir de estos datos, el estudio se centró en el reconocimiento de las líneas epiteliales de intestino. Es preciso comentar que las tres líneas de epitelio intestinal derivadas de carcinoma de colon tienen características diferentes, ya que Caco2 tiene fenotipo de células maduras adsorbentes, mientras que HT29 y T84 presentan un fenotipo de células inmaduras con alta tasa de replicación (202), características de células de la cripta. Si bien todas las líneas eran reconocidas por el clon, la lisis de T84 siempre fue mayor que la de las otras dos dianas, Caco2 y HT29 (**figura 1.6**).



**Figura 1.6:** Comparación de la reactividad de NEC44.25 frente a las líneas de epitelio intestinal. Tres ensayos diferentes muestran un reconocimiento más eficiente de la línea T84.

Esta mayor avidez del clon NEC44.25 por la línea T84 se confirmó en ensayos de inhibición fría. La lisis de T84 marcada era inhibida por la misma diana sin marcar y mucho menos por las otras dos o por el control. Sin embargo, cuando se utilizaban HT29 o Caco2 como dianas marcadas, la inhibición por T84 era siempre más eficiente (**figura 1.7**).

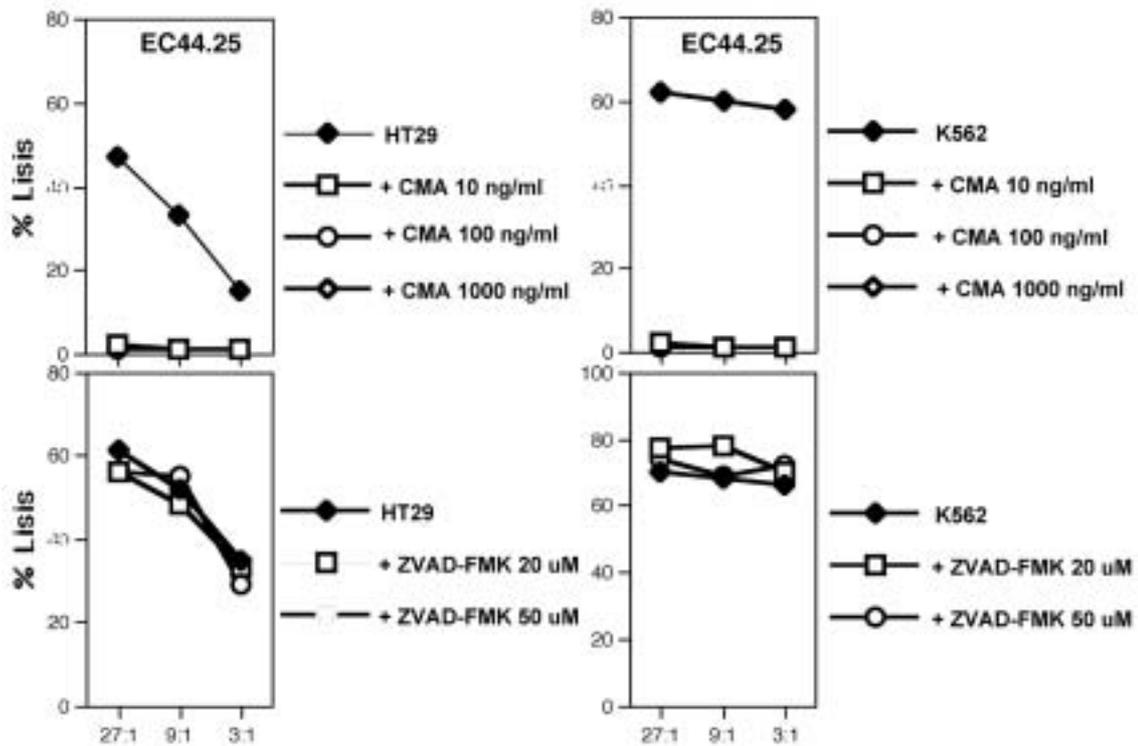


**Figura 1.7:** Inhibición de la lisis por células frías. Cada uno de los gráficos corresponde a la inhibición de la lisis de las dianas marcadas con  $^{51}\text{Cr}$  HT29, T84 y Caco2, respectivamente, por células no marcadas (frías). Se observa la mayor capacidad de T84 de inhibir la lisis de las diferentes dianas. Las figuras indican el porcentaje de inhibición (ordenadas) a diferentes relaciones diana fría:diana marcada.

### 1.5.1 Mecanismo de lisis de células epiteliales

Los dos mecanismos principales mediante los cuales una célula efectora lisa las células diana dependen de la liberación de perforina almacenada en gránulos preformados o la inducción de apoptosis en la célula diana a partir de la interacción entre FasL(CD178) en la célula citotóxica y Fas (CD95) en la superficie de la célula diana. A pesar de que el clon NEC44.25 en las condiciones del análisis mostraba ausencia de FasL en la superficie (ver figura 1.2), no se podía descartar la inducción de esta molécula tras el reconocimiento del ligando por el TCR. Se realizaron ensayos de inhibición de la lisis de dianas epiteliales y de K562 con inhibidores específicos de perforina (Concanamicina A) y de FasL (ZVAV-FMK). Como se puede observar en la **figura 1.8**,

la Concanamicina A inhibió eficientemente la lisis de células epiteliales y de K562, mientras que no se observó inhibición de la lisis por ZVAV-FMK. Estos datos demostraban que la lisis de ambas dianas estaba mediada por mecanismos dependientes de perforina y no de la interacción FasL/Fas.

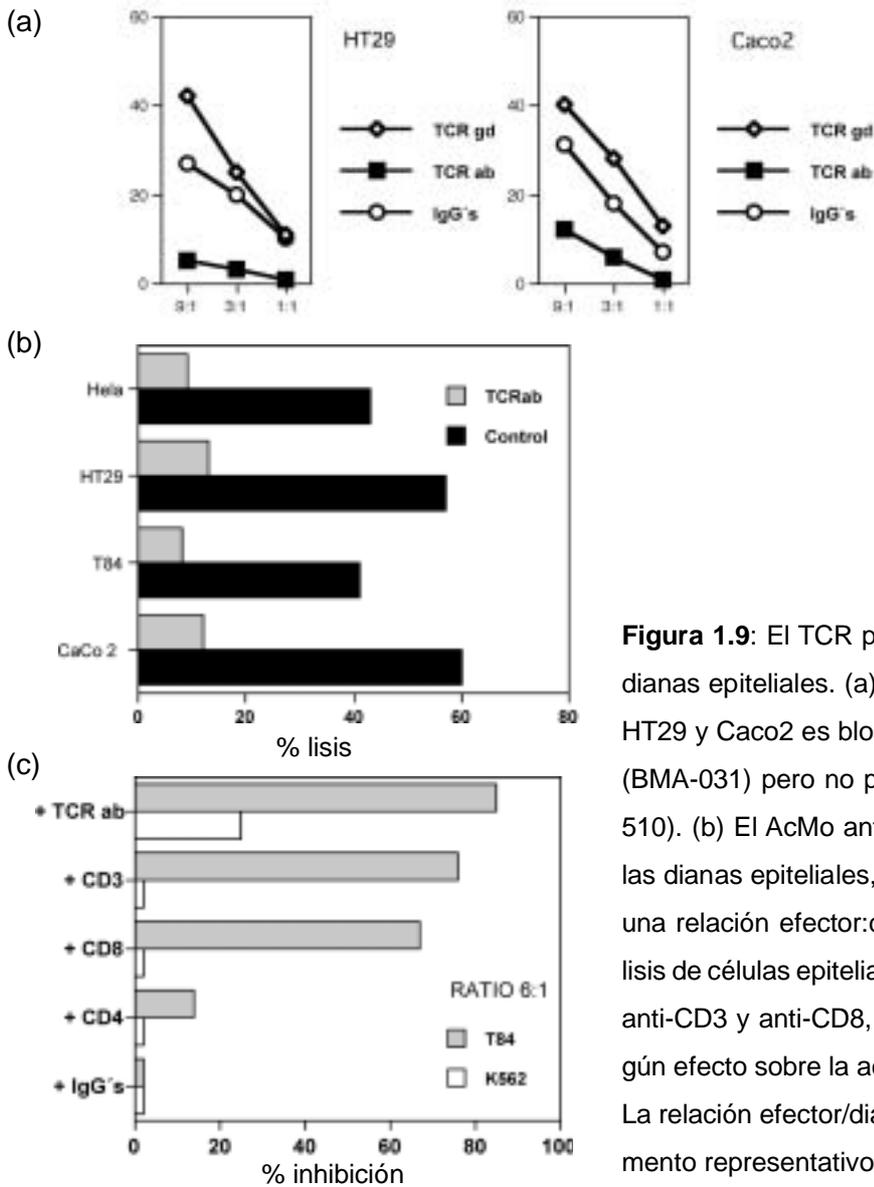


**Figura 1.8:** Mecanismo de citotoxicidad. La lisis de dianas epiteliales (HT29) y de las células K562 fue bloqueada por el inhibidor de perforina, Concanamicina A (CMA) (paneles superiores), mientras que el inhibidor específico de la vía de FasL (ZVAV-FMK) no afectó la lisis de dianas celulares por NEC44.25 (paneles inferiores). La figura muestra un experimento representativo.

## 1.6 El TCR está involucrado en el reconocimiento de células epiteliales pero no en la actividad NK

### 1.6.1 Inhibición de la citotoxicidad por AcMo $\alpha$ -TCR $\alpha\beta$

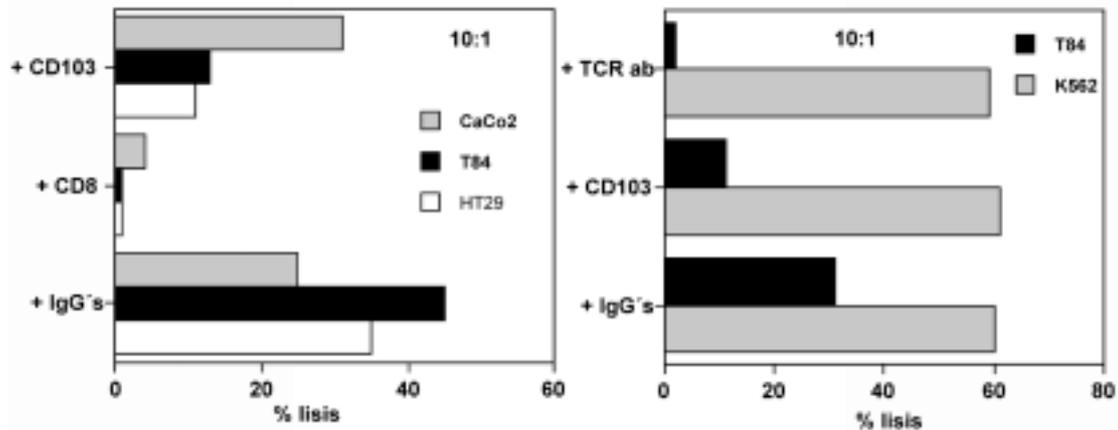
Para comprobar el papel del TCR en el reconocimiento de las dianas epiteliales y de K562, se hicieron experimentos de inhibición de la citotoxicidad, preincubando las células efectoras NEC44.25 con AcMo anti-TCR $\alpha\beta$ , utilizando como control un AcMo anti-TCR $\gamma\delta$ . Se observó que a diferentes relaciones efector:diana, sólo el anti-TCR $\alpha\beta$  redujo significativamente la lisis de las diferentes dianas epiteliales. Sin embargo, este anticuerpo no modificó la lisis de K562, indicando que el reconocimiento de las dos dianas estaba mediado por receptores diferentes. Por otra parte, los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD8 también inhibían la lisis de dianas epiteliales, pero no la de K562. La **figura 1.9** muestra experimentos representativos de estos datos. Estos resultados sugieren que la actividad citotóxica del clon NEC44.25 frente a las dianas epiteliales está mediada por el TCR, mientras que la actividad NK es independiente del TCR y probablemente mediada por otro receptor.



**Figura 1.9:** El TCR participa en el reconocimiento de dianas epiteliales. (a) El reconocimiento de las líneas HT29 y Caco2 es bloqueado por el AcMo anti-TCR $\alpha\beta$  (BMA-031) pero no por el AcMo anti-TCR $\gamma\delta$  (IMMU-510). (b) El AcMo anti-TCR $\alpha\beta$  inhibe la lisis de todas las dianas epiteliales, testadas en este experimento a una relación efector:diana de 6:1. (c) Inhibición de la lisis de células epiteliales (T84) por los AcMo anti-TCR, anti-CD3 y anti-CD8, que a su vez no mostraron ningún efecto sobre la actividad NK contra la línea K562. La relación efector/diana que se utilizó en este experimento representativo fue de 6:1.

### 1.6.2 CD103 y el reconocimiento de epitelio

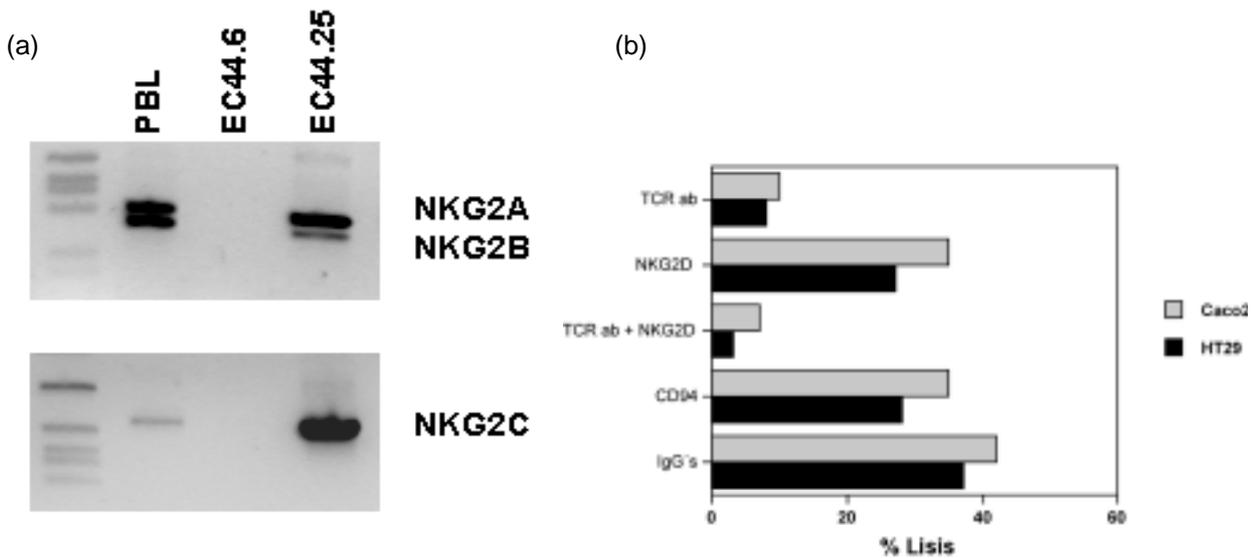
Si bien el reconocimiento del ligando por el TCR es el principal mediador de la lisis celular, otras moléculas como las integrinas pueden favorecer este reconocimiento y aumentar la interacción entre la célula T y las dianas epiteliales. Para ver si la integrina  $\alpha_E\beta_7$  podía estar involucrada en esta interacción, incidiendo sobre la lisis, realizamos ensayos de inhibición de la citotoxicidad con AcMo anti-CD103 ( $\alpha_E$ ). Se observó una clara reducción de la lisis de las dianas T84 y HT29 (>60% inhibición), pero ningún efecto sobre la lisis de la diana Caco2 ni de las células K562 (**Figura 1.10**).



**Figura 1.10:** Participación del CD103 en la interacción NEC44.25-epitelio. La inhibición de la citotoxicidad por el AcMo anti-CD103 se limitó a las dianas epiteliales HT29 y T84. Sin embargo, la lisis de Caco2 no se modificó en presencia del anticuerpo, al igual que la lisis de K562. La figura muestra dos experimentos representativos en que se comparan las tres dianas epiteliales (izquierda) y una de estas con K562 (derecha). Relación efector:diana 10:1 en ambos experimentos.

### 1.6.3 Receptores NK involucrados en el reconocimiento de líneas epiteliales

La dualidad funcional de las células NEC44.25 nos llevó a estudiar la posible intervención de otros receptores activadores que podrían llevar a cabo funciones efectoras sobre las células diana o actuar como moléculas coestimuladoras. Se había observado (**figura 1.2**) la expresión por NEC44.25 de dos receptores NK, NKG2D y CD94. La expresión por NEC44.25 de las moléculas que dimerizan con CD94, NKG2A y NKG2C, se determinó por RT-PCR (**figura 1.11a**) y ambas eran positivas. Por lo tanto ambos dímeros (CD94/NKG2A y CD94/NKG2C) podían ser expresados. Sin embargo, ni el AcMo anti-NKG2D (1D11) ni el anti-CD94 (Kp43) demostraron capacidad de inhibir la citotoxicidad contra dianas epiteliales, descartándose un efecto directo de estas moléculas sobre el reconocimiento de las células epiteliales (**figura 1.11b**). Estos receptores podrían estar actuando en la lisis de K562, independientemente del TCR. Sin embargo, ninguno de los dos anticuerpos demostró capacidad de inhibición de la citotoxicidad anti-K562 (datos no mostrados), descartándose una función directa de estos receptores en la actividad de tipo NK de NEC44.25.



**Figura 1.11:** CD94 y NKG2D no están implicados en la lisis de las células epiteliales. (a) Imagen invertida de un gel de BrEt en el que se observa la expresión de las tres isoformas de NKG2 (A, B y C) en el clon NEC44.25. Como control positivo se utilizaron PBMC y como control negativo un clon CD4<sup>+</sup> (NEC44.6) (b) Los AcMo anti NKG2D y anti-CD94 no inhiben la citotoxicidad específica sobre las células epiteliales. Sólo los AcMo anti-TCR reducen el porcentaje de lisis.

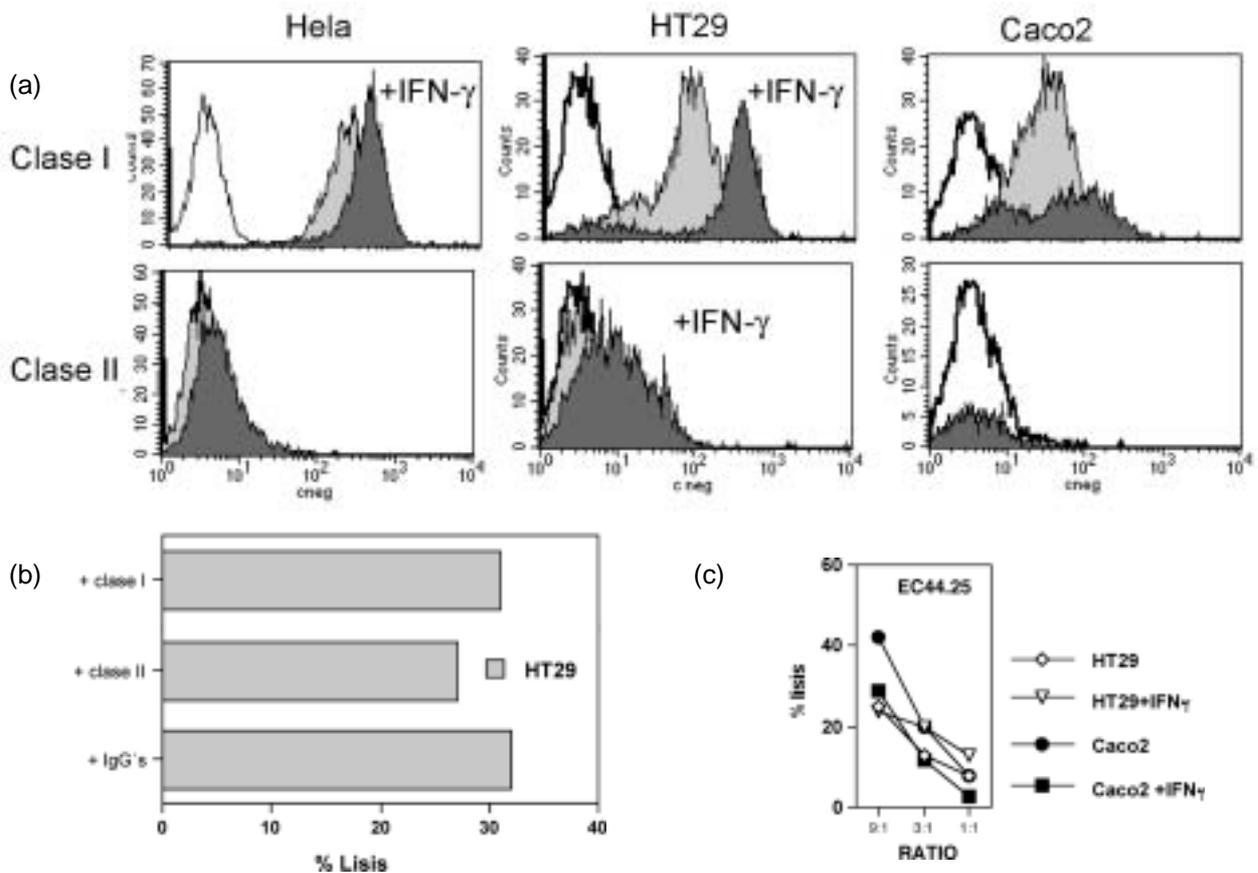
### 1.7 En busca del ligando epitelial. Las moléculas de HLA clase I y clase II no están involucradas en el reconocimiento de células epiteliales

Para tratar de identificar el ligando reconocido por el TCR, había que investigar primero si alguno de los elementos de restricción clásicamente asociados a este reconocimiento, es decir, las moléculas del MHC, estaban involucrados. La expresión de MHC de clase I es constitutiva en las líneas epiteliales utilizadas, mientras que clase II sólo se induce en la línea HT29 tras estimulación con IFN- $\gamma$  (figura 1.12a). Sin embargo, el reconocimiento de una molécula clásica de clase I por este clon sólo sería posible si se tratara de una restricción alogénica, ya que todas las células epiteliales tienen distinto genotipo HLA (datos no mostrados). Por otra parte, no se podía descartar el reconocimiento de una molécula no clásica (clase Ib) no polimórfica.

Se hicieron ensayos de inhibición de la citotoxicidad en los que se observó la ausencia de bloqueo por un AcMo anti-clase I (W6/32), descartando las moléculas de clase I clásicas como elementos de restricción de este reconocimiento (figura 1.12b). Algunas moléculas no clásicas de MHC de clase I como HLA-G y E, también quedaron descartadas, ya que W6/32 también las reconoce y por lo tanto inhibiría su interacción con el TCR. Sin embargo, no se pudieron descartar otras moléculas no clásicas dentro o fuera del MHC, no reconocidas por este AcMo (ver más adelante).

Por otra parte, el tratamiento con IFN- $\gamma$  induce la expresión de MHC de clase II y aumenta la expresión de clase I en las células epiteliales y otros tipos celulares. En el caso de las dianas epiteliales que estábamos estudiando, el IFN- $\gamma$  aumentó la expresión de clase I en todas las células mientras que sólo en HT29 se observó la inducción de la expresión de clase II (**figura 12a**). Sin embargo, el tratamiento con IFN- $\gamma$  de estas dianas epiteliales no tuvo ningún efecto sobre la lisis mediada por NEC44.25 (**figura 1.12c**). Esto sugiere que el ligando reconocido por este clon no está bajo efectos del promotor de IFN- $\gamma$  y confirma que las moléculas del MHC clásicas no están involucradas en el reconocimiento.

El hecho de que el TCR intervenga en el reconocimiento de las células epiteliales pero no las moléculas de HLA de clase I ni de clase II, nos llevó a estudiar otros posibles ligandos del TCR, como las moléculas de tipo MHC, CD1 y MICA/B, que no son reconocidas por W6/32.

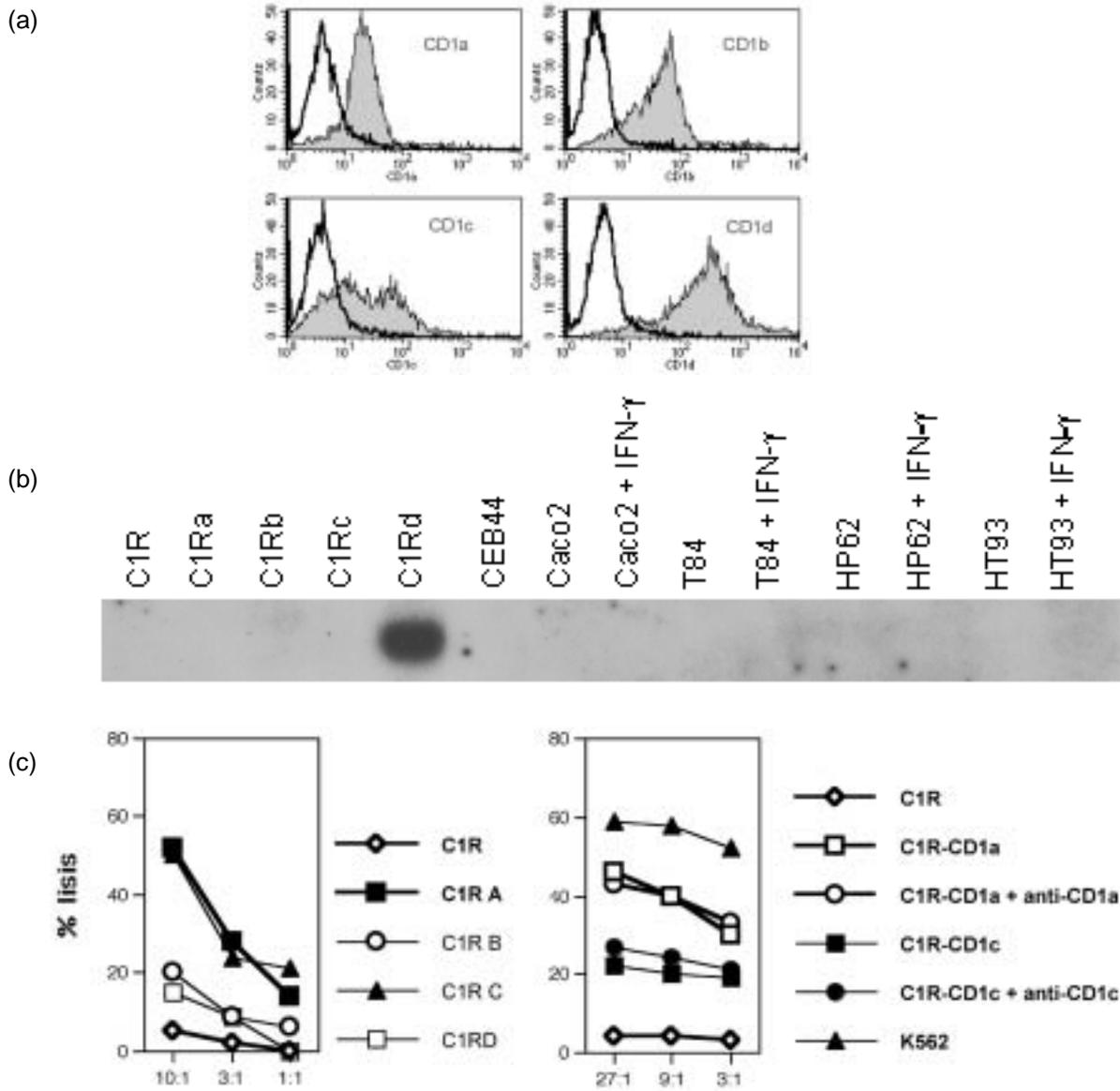


**Figura 1.12:** Las moléculas clásicas de HLA de clase I y de clase II no están implicadas en el reconocimiento de las dianas epiteliales por NEC44.25. (a) Expresión de clase I y de clase II por tres dianas epiteliales antes y después del tratamiento con 500 U/ml de IFN- $\gamma$  durante 16 h. (b) Ausencia de inhibición de la citotoxicidad por anticuerpos monoméricos anti clase I y anti clase II (c) El tratamiento con IFN- $\gamma$  no afecta significativamente la lisis de dianas epiteliales por NEC44.25. Se muestran experimentos representativos.

### 1.7.1 CD1

Las moléculas CD1 son moléculas de tipo clase I que se asocian a  $\beta_2m$ , pero no están codificadas dentro del MHC y tienen capacidad de presentación de antígenos de naturaleza variada, frecuentemente no proteica. En 1991 se describió la restricción por CD1a y CD1c del reconocimiento de dianas por ciertos IELs (161). Por otra parte, se había descrito la expresión de CD1d en las líneas celulares de epitelio intestinal así como en enterocitos (166, 212). Sin embargo, no pudimos demostrar dicha expresión en enterocitos ni en líneas epiteliales por citometría de flujo ni por Northern blots. Esta expresión se comparó con células LCL C1R (HLA-A y B negativas) transfectadas con los distintos isotipos de CD1. La **figura 1.13a y b** muestra la expresión de CD1 en las tranfectantes y la ausencia de expresión de CD1d por Northern blot en las células epiteliales. A pesar de ello, decidimos determinar si NEC44.25 (CD8<sup>+</sup>) tenía la capacidad de reconocer alguno de los isotipos de CD1.

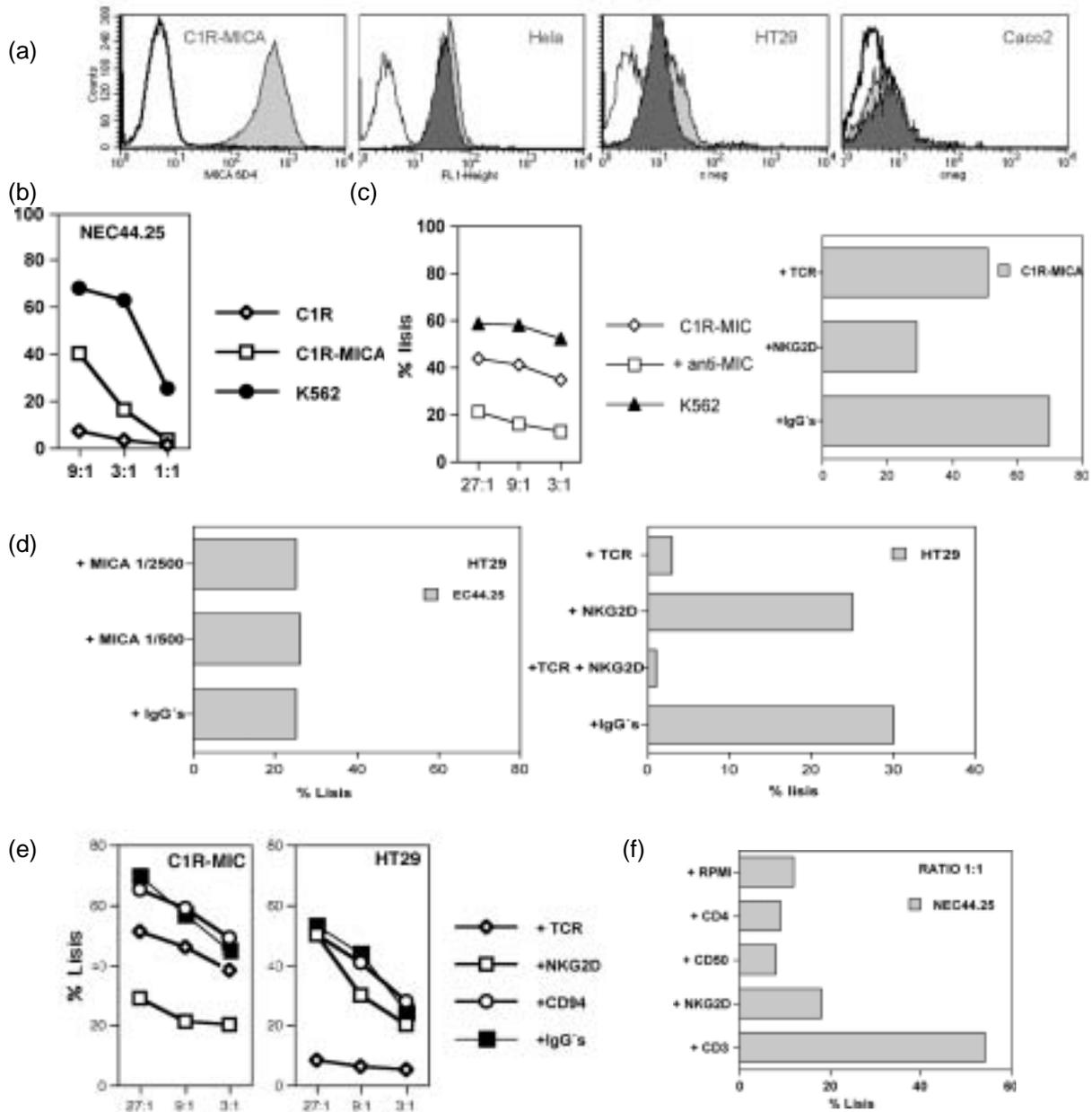
Se analizó la citotoxicidad de NEC44.25 frente a las distintas tranfectantes (**figura 1.13c**). El reconocimiento de las tranfectantes CD1a y CD1c indicaba que el clon tenía la capacidad de interaccionar con estas moléculas. No obstante, ni los anticuerpos específicos anti-CD1a y anti-CD1c ni los anticuerpos anti-CD3 (no mostrado), inhibían la lisis de las tranfectantes. Por otra parte, las células epiteliales no expresaban ninguno de los cuatro isotipos de CD1. Los datos pues sugerían que, aunque CD1a y c podían ser reconocidos por la célula citotóxica, no podían ser los ligandos que el TCR reconocía en el epitelio. Como último control, las células NSO transfectadas con CD1a (10B3) y CD1c(NR7), no fueron reconocidas por el NEC44.25 (datos no mostrados). Todos estos resultados sugerían la posibilidad de un reconocimiento no específico de las tranfectantes C1R-CD1a y c por este clon, independiente del TCR y de CD1.



**Figura 1.13:** (a) Expresión de CD1 en las líneas transfectadas C1R-CD1a, CD1b, CD1c y CD1d. (b) Northern blot. El RNA total de las diferentes líneas celulares fue transferido a una membrana de Nitrocelulosa e hibridado con una sonda específica para CD1d. Sólo la transfectante C1R-CD1c era positiva (ver materiales y métodos). (c) NEC44.25 lisa las líneas C1R-CD1a y C1R-CD1c, pero los AcMo anti-CD1a (OKT6) y anti-CD1c (L161) no afectan la lisis de las transfectantes.

### 1.7.2 Reconocimiento de MICA vía NKG2D. EL TCR no participa de este reconocimiento

A diferencia de CD1, MICA y MICB son moléculas no clásicas expresadas a niveles variables por las líneas epiteliales (**figura 1.14a**). Estas moléculas se codifican en un gen dentro del MHC y tienen características de clase I pero no requieren péptido ni  $\beta_2m$  para su expresión en superficie. Se las considera moléculas de estrés. Si bien MIC es una molécula asociada al reconocimiento de ciertos receptores T  $\gamma\delta$  (*ver capítulo IV*), está demostrado que puede jugar un papel en los linfocitos T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup>, tanto como dianas de citotoxicidad como ejerciendo un papel coestimulador. Por otra parte NKG2D es el ligando preferencial de MIC y es capaz de dirigir citotoxicidad independiente del TCR (213). Dada la expresión de MIC por las células epiteliales y la expresión de NKG2D por NEC44.25, estudiamos el posible papel de estas moléculas en la citotoxicidad anti epitelio demostrada por el clon CD8<sup>+</sup>. Como control, utilizamos células C1R transfectadas con MIC, que tienen alta expresión de esta molécula en la superficie (**figura 1.14a**). En ensayos de citotoxicidad, las transfectantes eran eficientemente lisadas por el clon NEC44.25, a niveles similares a los de las dianas epiteliales (**figura 1.14b**). Esta citotoxicidad era además inhibida por AcMo anti-MIC (6D4, SR116, SR104). Sin embargo, el anticuerpo anti-TCR $\alpha\beta$  no inhibía la lisis de las transfectantes, pero sí lo hacía un anticuerpo específico del ligando de MIC, NKG2D (2D11), que expresaba la célula efectora (**figura 1.14c**). Estos resultados sugerían que la interacción NKG2D/MIC podía ser funcional en estas células pero que no era la responsable de la especificidad anti-epitelio mediada por el TCR. En efecto, ninguno de los anticuerpos anti-MIC ni el anticuerpo anti-NKG2D inhibieron la lisis de dianas epiteliales por NEC44.25 (**figura 1.14d**). Anticuerpos específicos de CD94, expresada por NEC44.25, tampoco fueron capaces de inhibir la lisis (**figura 1.14e**). La capacidad funcional del receptor NKG2D en estas células quedaba sin embargo demostrada por la capacidad del anticuerpo específico de esta molécula de inducir la lisis redirigida de las células diana P815, aunque a niveles más bajos que el anticuerpo anti-CD3 (**figura 1.14f**). En resumen, podemos concluir que la citotoxicidad anti epitelio de las células NEC44.25 no está mediada por la interacción NKG2D/MIC, por más que estas dos moléculas se expresan respectivamente en las células efectoras y las dianas epiteliales y que la interacción es potencialmente funcional.

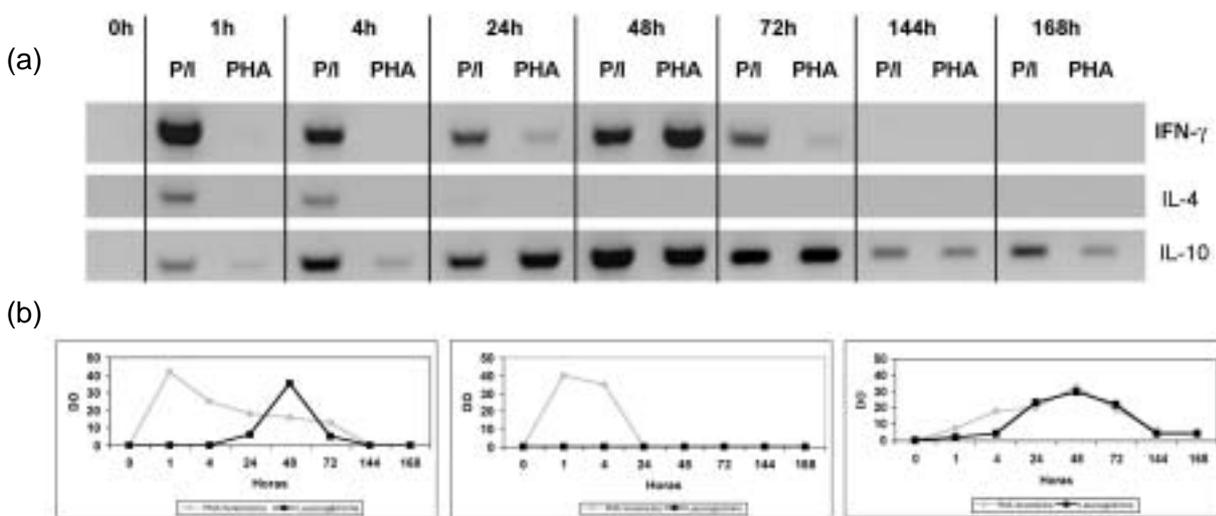


**Figura 1.14:** Reconocimiento de MICA/B por NEC44.25. (a) Expresión de MIC en las células epiteliales y en las transfectantes C1R-MIC. Las líneas HeLa y HT29 expresan MIC tras 24h (histograma gris oscuro) y 48 h (gris claro) de cultivo. La expresión de MIC en Caco2 fue prácticamente negativa. En las células transfectadas, la expresión es mucho más alta. (b) Lisis de las células C1R-MIC. La lisis de las transfectantes fue siempre positiva a niveles medios, menores que los niveles de lisis de K562. (c) La lisis de C1R-MIC es inhibida con AcMo específicos de MIC (panel de la izquierda) y de NKG2D, pero no con AcMo anti-TCR (panel de la derecha). (d) Al contrario de las transfectantes, las células epiteliales HT29 son reconocidas a través del TCR y su lisis no se modifica por la acción de AcMo anti-MIC (izquierda) ni anti-NKG2D (derecha). (e) CD94 no participa en el reconocimiento de las transfectantes C1R-MIC (izquierda) ni en el de las células epiteliales (derecha). (f) La lisis redirigida sobre P815 demuestra la funcionalidad de NKG2D en NEC44.25. La lisis de P815 es inducida con anti-CD3 (OKT3; 1/500) y también pero menos eficientemente con anti-NKG2D (1D11; 1/1000). Como control negativo se utilizaron AcMo anti-CD4 (1/20) y anti-CD50 (1/20), siempre a una relación E:T de 1:1.

### 1.8 Producción de citoquinas

La expresión de citoquinas en este clon se determinó a nivel de mRNA por Real Time PCR (IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-10) y de proteína por CBA (Cytometry Bead Array) (ver materiales y métodos). Previamente se determinaron las condiciones óptimas para la detección de mRNA y de proteína de las distintas citoquinas.

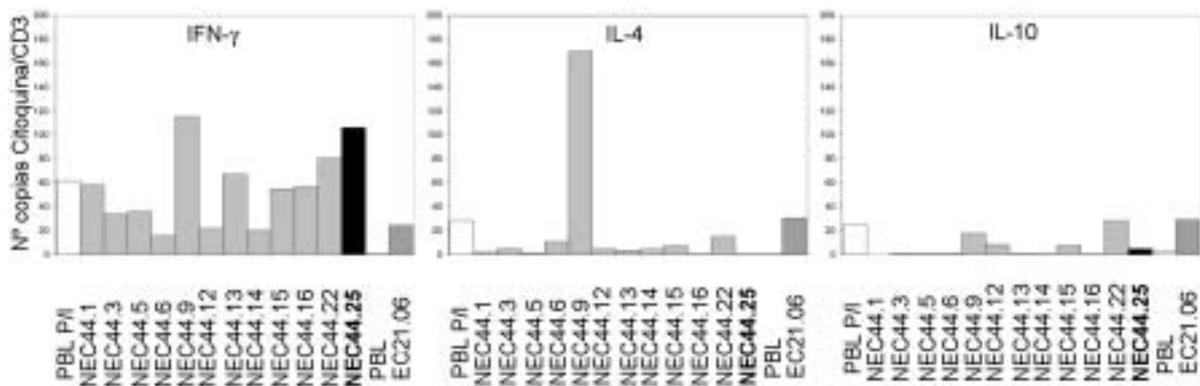
El tiempo óptimo de producción de citoquinas (IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10) se determinó en PBL, por RT-PCR convencional. Las células se estimularon a distintos intervalos, con dos estímulos policlonales: PMA/Ionomomicina (PMA/I) y Leucoaglutinina (PHA-L). La representación densitométrica de las bandas en BrEt vs el tiempo de estimulación, se muestra en la **figura 1.15**. El tiempo óptimo se consideró 4h para los PBL estimulados con PMA/I. A los 7 días de estimulación con PHA-L (condición habitual de estimulación de nuestros clones para su crecimiento) comprobamos que NEC44.25 carece de expresión de mRNA de estas tres citoquinas. El establecimiento de un tiempo óptimo de estimulación que permita detectar las citoquinas es importante, ya que en algunos casos, sobre todo IL-4, la expresión de mRNA es muy baja y de corta duración.



**Figura 1.15:** Síntesis de mRNA de IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-10 en función del tiempo y del estímulo. (a) Imagen invertida de un gel de BrEt donde aparecen las bandas de amplificación correspondientes a las tres citoquinas tras estimulación con PMA/I o PHA-L a diferentes tiempos. (b) Representación gráfica de la densitometría de las bandas de PCR en función del tiempo y del estímulo. Dado que la síntesis de mRNA para IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 es dependiente del tiempo y del estímulo, se tuvo que establecer un tiempo consenso. A las 4 h de estimulación con PMA/I se pudo detectar la expresión de las tres citoquinas. Las concentraciones utilizadas fueron: PMA: 25 ng/ml; Ionomomicina: 1 ug/ml; PHA-L: 0.5 ug/ml.

### 1.8.1 Determinación de la expresión de citoquinas por PCR a Tiempo Real

Establecidas las condiciones óptimas de síntesis de mRNA en PBL, se estimuló el clon NEC44.25 y el resto de los clones NEC44 como controles estándares de expresión con PMA/I durante 4h. La expresión de las tres citoquinas se cuantificó por PCR a Tiempo Real. Para ello se diseñaron nuevos cebadores más sensibles (IL-4) y que no formaran híbridos entre cebadores (IFN- $\gamma$ ) (ver materiales y métodos). El número de copias de cDNA se normalizó según el número de copias de CD3 transcritas en cada muestra. Como se observa en la **figura 1.16**, el clon NEC44.25 expresó un alto número de copias de cDNA para IFN- $\gamma$ , pero no IL-4 ni IL-10.



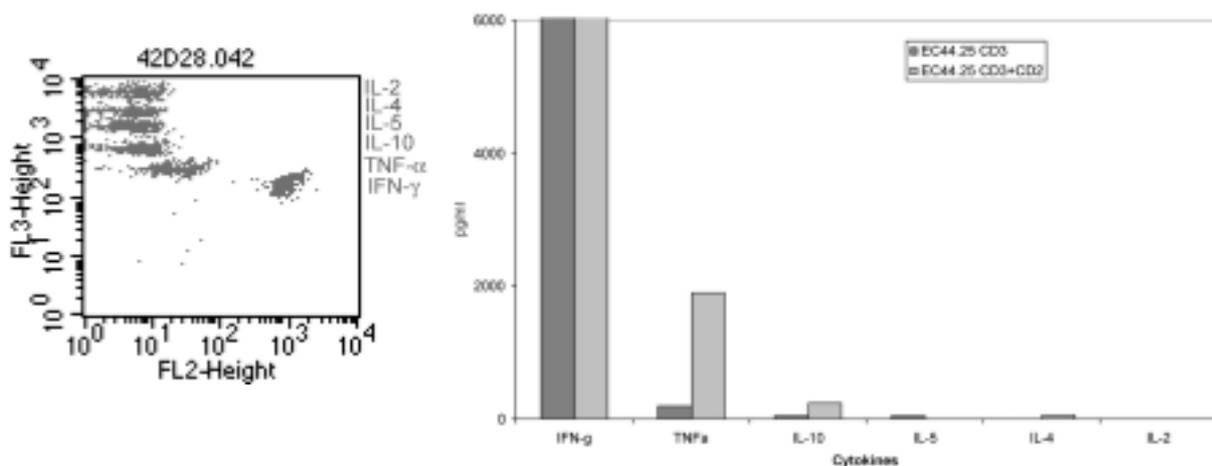
**Figura 1.16:** Expresión de citoquinas por PCR a tiempo real en los clones NEC44 (todos CD4<sup>+</sup> menos NEC44.25). El clon NEC44.25 expresó altos niveles de IFN- $\gamma$ , pero no IL-4, ni IL-10. Uno de los clones CD4<sup>+</sup> (NEC44.9) mostró un alto nivel de expresión de IL-4. Como control se muestran los resultados de PBL estimulados con PMA/I y sin estimular, además de un clon control (EC21.06) que expresa IL-4. Uno de los clones CD4<sup>+</sup> (NEC44.9) mostró muy alta expresión de IL-4, por encima del control positivo. Los resultados representan el cociente entre el número de copias de cDNA de cada citoquina sobre el número de copias de CD3. En el caso de IL-4 e IL-10 los datos están multiplicados por 100.

### 1.8.2 Detección de citoquinas por CBA

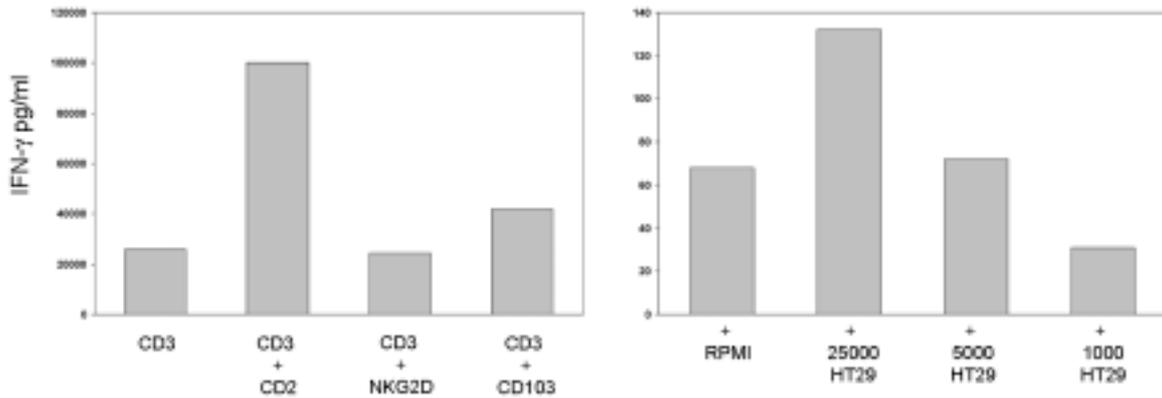
Esta técnica permite detectar simultáneamente la secreción de seis citoquinas diferentes al sobrenadante de células en cultivo. Además de las analizadas por PCR, se determinó la producción de IL-2, TNF- $\alpha$  e IL-5 por el clon NEC44.25. La secreción al medio se puede detectar eficientemente activando el TCR, por lo cual las células fueron estimuladas durante 48 hs con AcMo anti-CD3 y -CD2. Los datos mostrados en la **figura 1.17** confirmaron la producción de IFN- $\gamma$  a niveles superiores a  $10^5$  pg/ml por 50.000 células estimuladas. Los niveles de TNF- $\alpha$  también fueron muy elevados (2.000 pg/ml). Se detectó muy baja cantidad de IL-10 (240 pg/ml) y nada de IL-4, IL-5, ni IL-2 (<1 pg/ml).

La estimulación con anti-CD3 además de un coestímulo (anti-CD2), mimetiza la activación óptima del TCR. Para determinar si la molécula NKG2D tenía un papel coestimulador del TCR de este clon CD8<sup>+</sup>, tal como se ha publicado en otros clones de este fenotipo, se comparó la acción del AcMo anti-CD2 con el AcMo anti-NKG2D como coestímulo de la producción de IFN- $\gamma$ . Se observó que NKG2D no era capaz de aumentar la producción basal de IFN- $\gamma$  inducida por la estimulación con anti-CD3. Es interesante observar que el anticuerpo anti-CD103 produjo un aumento de la producción de IFN- $\gamma$ , aunque no llegó a los niveles del AcMo anti-CD2, confirmando una vez más el papel potenciador de CD103 en la acción del TCR de este clon (**figura 1.18a**). Ninguno de los dos anticuerpos modificó la producción de TNF- $\alpha$  ni de ninguna de las otras citoquinas.

Finalmente se estudió el efecto del reconocimiento específico de células epiteliales sobre la capacidad del clon de producir IFN- $\gamma$ . Se observó que el cocultivo durante 48h de NEC44.25 con las células epiteliales HT29, inducía la producción de IFN- $\gamma$  a bajos niveles, de manera dosis dependiente (**figura 1.18b**). Ninguna de las otras citoquinas, incluido el TNF- $\alpha$ , se detectaron en estas condiciones.



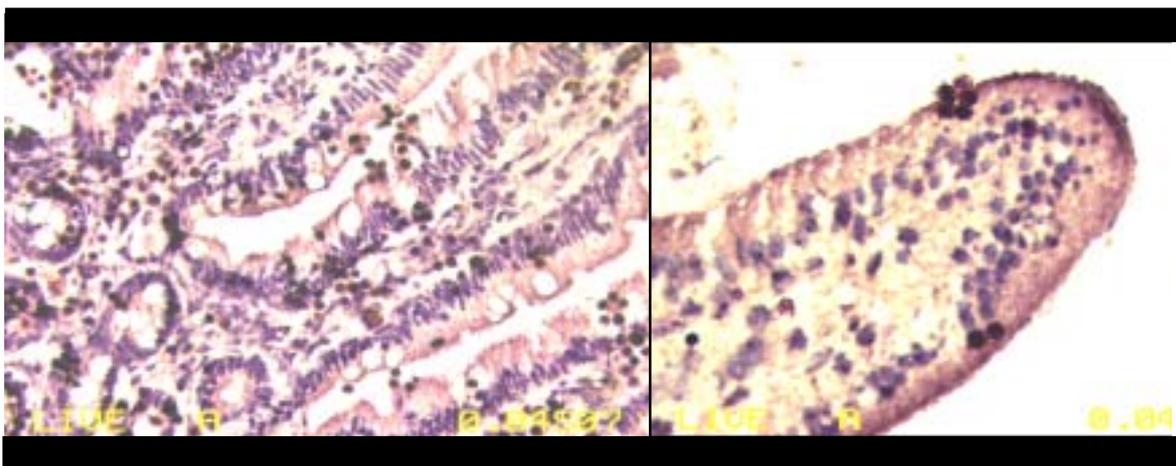
**Figura 1.17:** Determinación de citoquinas por CBA. La producción de citoquinas se midió en el sobrenadante (dilución 1:20) del clon NEC44.25 tras estimulación con anti-CD3 (OKT3) y anti-CD2 (204-12) durante 48 h. (a) Representación del patrón de citoquinas luego de la estimulación. El desplazamiento de los puntos hacia la derecha indica presencia de la citoquina en la muestra. La intensidad de FL2 representa la cantidad de citoquina liberada. En FL3 están representadas las distintas citoquinas. (b) Cuantificación de las citoquinas producidas por el clon. Los resultados muestran expresión de IFN- $\gamma$  (>100.000 pg/ml) y TNF- $\alpha$  (> 2.000 pg/ml). No se detectó expresión de IL-4, IL-5 e IL-2. La producción de IL-10 fue baja (240 ng/ml).



**Figura 1.18:** Coestimulación del clon NEC44.25 para la producción de IFN- $\gamma$ . (a) Los datos muestran que sólo se induce producción de IFN- $\gamma$  tras la estimulación con anti-CD3 y anti-CD2. El AcMo anti-NKG2D (1D11) no aumenta la producción de IFN- $\gamma$  inducida por el anti-CD3 sólo. El AcMo anti-CD103 aumenta la producción de IFN- $\gamma$ , confirmando su capacidad de potenciar la activación del TCR. (b) El cocultivo del clon NEC44.25 con las células epiteliales HT29 induce la síntesis de IFN- $\gamma$  a bajos niveles (ver escala) tras 48 hs de cultivo de una manera dependiente de dosis. No se detectaron ninguna de las otras citoquinas en estas condiciones.

### 1.9. Citoadherencia sobre secciones de tejido

El fenotipo de NEC44.25 sugería claramente una célula IEL CD8<sup>+</sup> cuya función se podría considerar de vigilancia del epitelio y con un posible papel en la eliminación del epitelio dañado. Para confirmar esta idea y determinar si el clon NEC44.25 tenía una distribución preferencial sobre el epitelio intestinal, las células T se marcaron con AcMo anti-HLA clase-I, se incubaron sobre secciones de tejido de duodeno y se tiñeron con anticuerpo anti-IgG ligado a peroxidasa. Se observó una distribución homogénea sobre todo el epitelio, tanto sobre las vellosidades como sobre las criptas (**figura 1.19**). No se observó tinción alguna en las zonas de submucosa.



**Figura 1.19:** Adherencia de las células NEC44.25 sobre secciones de tejido intestinal. La distribución de los linfocitos NEC44.25, previamente marcados con AcMo anti-HLA clase-I y peroxidasa, ocurre tanto sobre el epitelio de la vellosidad como sobre las criptas. Las células superpuestas pueden ser fácilmente detectadas por su diferente plano focal y por la tinción con peroxidasa. No se detectaron células marcadas en las zonas de submucosa.



*Discusión I*

---



La expresión de CD103 en un clon de linfocitos aislado de una mucosa normal indica que se trata seguramente de un IEL. Si bien en la lámina propia existen linfocitos que expresan esta integrina, muchos de éstos son circulantes de la mucosa que se dirigen hacia el epitelio. La baja eficiencia en la recuperación de IELs CD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> de la biopsia NEC44 pudo deberse a que el clonado no fuera lo suficientemente exhaustivo, de manera que se favoreciera el crecimiento de linfocitos CD4<sup>+</sup>, que generalmente tienen mayor capacidad de crecimiento *in vitro*. Al igual que la mayoría de los IELs, NEC44.25 expresa el correceptor CD8 $\alpha\beta$  y no CD28. La posibilidad de expandir *in vitro* este clon CD8<sup>+</sup>, nos permitió realizar una serie de estudios fenotípicos, que nos han servido para estandarizar técnicas que posteriormente se utilizaron para el análisis de otros linfocitos, como se verá en los siguientes capítulos.

Este clon utiliza los segmentos variables V $\alpha$ 6 y V $\beta$ 5. El segmento TRV $\alpha$ 6 (o TRAV14/DV4 según la nueva nomenclatura) también puede ser reordenado por la cadena delta de los linfocitos  $\gamma\delta$ . No todos los segmentos V $\alpha$  tienen esta dualidad de uso y aunque no se conoce si pueden o no tener una función específica, una posibilidad sería que los receptores  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$  que los utilizan estuvieran involucrados en el reconocimiento de ligandos no clásicos. Por otra parte, la presencia de la cadena V $\beta$ 5 indicaría que el NEC44.25 podría ser representativo de la población de IELs, ya que al igual que V $\beta$ 3, V $\beta$ 6 y V $\beta$ 13, V $\beta$ 5 se encuentra muy representada en esta población tanto en mucosa normal como celíaca (164).

Como hemos mencionado en la introducción, ya se habían descrito IELs con reactividad epitelial (167,214). Sin embargo se trata de IELs con características diferentes al descrito en este capítulo: no tienen reactividad mediada por el TCR y carecen de expresión de CD16 y CD56, de reactividad sobre la línea K562 y de citotoxicidad redirigida por anticuerpos. NEC44.25 mostró un reconocimiento de células de origen epitelial mediado por el TCR. Dentro de esta reactividad destacamos una mayor avidéz hacia una línea (T84) comparando con otras dos también derivadas de carcinoma de colon (Caco2 y HT29). Esta mayor citotoxicidad, puede deberse a un mayor nivel de expresión del ligando en estas células, lo que aumentaría la eficiencia de lisis, o a la presencia de otras moléculas (adhesión), que favorecerían este reconocimiento. Esto último explicaría la inhibición diferencial de la lisis de T84 y Caco2 con el AcMo anti-CD103. Están establecidas diferencias fenotípicas entre las diferentes dianas epiteliales, por ejemplo, el ligando de la  $\alpha_E\beta_7$  (E-cadherina) no se expresa en Caco2 pero si en HT29 (215,216). Esto podría ser aplicable también a T84, ya que otros autores han demostrado que la interacción de IELs con las células epiteliales T84 y HT29 está mediada por  $\alpha_E\beta_7$  y LFA-1 y que la expresión de CD103 aumenta en presencia de TGF- $\beta$  (217,218). Este incremento no ocurre en presencia de IFN- $\gamma$ , lo que se corresponde con que los datos de citotoxicidad no se alteren en presencia de esta citoquina.

La interacción entre CD103 y la E-cadherina aumentaría la avidéz de la interacción IEL-célula epitelial pero también podría generar señales hacia el citoplasma, tanto de la célula T como de la epitelial (133). Hemos visto que la producción de IFN- $\gamma$  a través del TCR aumentaba (x2) en presencia de anti-CD103. Por lo tanto CD103, igual que otras integrinas, sería una vía de señalización a través de la cual se puede incrementar la proliferación y la liberación de citoquinas

(219,220). En la célula epitelial, las E-caderinas se asocian en el citoplasma a proteínas denominadas cateninas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) que interaccionan con fibras del citoesqueleto. Las  $\beta$ -cateninas pueden acumularse en el núcleo y a través de la unión con factores de transcripción, disparar la expresión de genes que pueden llevar a la proliferación o inhibición de la apoptosis (215).

Cuál es el ligando del TCR de este clon IEL? Descartamos a las moléculas clásicas y muchas de las no clásicas de HLA clase-I y clase-II, ya que AcMo's monomórficos contra estas moléculas no interfieren en la lisis. Además, la expresión del ligando no parece estar bajo un promotor inducible por IFN- $\gamma$ , ya que el tratamiento con esta citoquina no modifica el reconocimiento. Si bien este ligando no está presente (o se expresa a niveles subóptimos) en enterocitos primarios, sí se expresaría en tirocitos aislados de pacientes con enfermedad de Graves, pero no de tiroides no autoinmunes.

Si bien hubo un reconocimiento diferencial de las transfectantes C1R-CD1a y C1R-CD1c (y no de CD1b o CD1d), la ausencia de bloqueo con AcMo descarta a estas moléculas el papel de antígeno diana reconocido por este clon. Otra evidencia en contra es la ausencia de estas moléculas de tipo clase-Ib en las líneas epiteliales utilizadas, así como la falta de lisis en transfectantes hechos sobre líneas NSO (NSO-CD1a, 10B3 y NSO-CD1c, NR7 (221) (datos no mostrados). Las regiones V $\alpha$  y V $\beta$  tampoco se corresponden con ninguno de los reordenamientos de clones específicos de CD1c descritos por otros autores (161). Ya que no se ha demostrado la expresión de estas isoformas de CD1 en el epitelio intestinal, está por demostrarse el papel de estas moléculas en la interacción con los IELs, así como la expresión de CD1d en el epitelio (212), que no hemos podido reproducir. Posiblemente el papel de CD1 asociado con la función de los IELs quede relegado a un segundo plano, ya que en ratones KO de CD1 no hay modificación del número de IELs en el epitelio (127).

Una molécula de clase Ib que las líneas epiteliales expresan es MIC, que actúa como coestimuladora en algunas poblaciones CD8<sup>+</sup> a través de su receptor NKG2D (222). NEC44.25 reconoce MIC en las células transfectadas, en las cuales la alta expresión de MIC dispara la citotoxicidad mediada por NKG2D, presente en el clon NEC44.25 a niveles medios. Sin embargo el reconocimiento de las células epiteliales, que también expresan MIC, está mediado por el TCR y no por NKG2D. La explicación podría estar en que el umbral de activación para inducir la lisis mediada por NKG2D sólo se alcanza con altos niveles de expresión. La baja pero positiva lisis redirigida de P815 a través de NKG2D, así como la poca capacidad de coestimulación en la producción de IFN- $\gamma$  se podrían explicar por la baja expresión del receptor o bien de la proteína adaptadora DAP10, a través del cual actúa (213).

La línea HT29 expresa el ligando de CD94, HLA-E (147), pero la ausencia de bloqueo con el AcMo W6/32 descarta que sea el ligando responsable de la actividad citotóxica del clon. Si bien detectamos mRNA de NKG2A y NKG2C, queda por saber si las dos isoformas asociadas a CD94 se expresan en la membrana de estos linfocitos T. Niveles de expresión como los observados en las NEC44.25 se han asociado con expresión del dímero CD94/NKG2A (inhibidor) en superficie (147). Sin embargo, de existir en membrana el heterodímero CD94/NKG2C (activador), este no

estaría implicado en la lisis de las células epiteliales, según demuestran los ensayos de inhibición con el AcMo 3B1. El análisis de un mayor número de IELs (capítulo 2) mostró que algunos pero no todos los clones IEL CD8<sup>+</sup> con alto nivel de reactividad, carecían de la expresión de CD94, tanto en EC como en controles. Otros receptores NK no analizados también podrían estar participando en el reconocimiento o actividad NK del clon.

El clon muestra un fenotipo de tipo Tc1, con alta expresión de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Qué efecto producen estas citoquinas? Tanto el IFN- $\gamma$  como el TNF- $\alpha$  están asociados a la respuesta tipo Th1 y se inducen tras infecciones bacterianas o víricas, incrementando la actividad citotóxica de células T y macrófagos. Las células Tc1 producen *in vitro* estas citoquinas, que *in vivo* pueden estar relacionadas con una función de vigilancia de la mucosa para la eliminación de células infectadas o tumorales. Es de destacar que la línea HT29 es capaz de inducir la síntesis de IFN- $\gamma$  por NEC44.25, lo que implicaría que la interacción con el ligando sería capaz de modular la respuesta a través de la secreción de citoquinas, además de inducir la lisis. El IFN- $\gamma$  es capaz de incrementar la expresión del componente secretorio en enterocitos y junto al TNF- $\alpha$  inducen la liberación y activación de metaloproteinasas. Ambas citoquinas estarían implicadas en la muerte y pero también en la regeneración del epitelio (223). Los ensayos de citoadherencia, por su parte, indicarían una distribución de IELs uniforme tanto en la cripta como en la vellosidad, posiblemente mediado por la interacción  $\alpha^E\beta 7$  con la E-caderina.

Concluimos que este clon con reactividad epitelial está reconociendo a través de su TCR un ligando expresado en células epiteliales tumorales, distinto de las moléculas clásicas de HLA de clase I y clase II y/o de las moléculas tipo HLA no clásicas como CD1. La inducción de la lisis por la célula diana, así como la producción de IFN- $\gamma$ , sugieren un rol de este tipo de linfocitos en el reconocimiento de epitelios modificados. Posiblemente sean estas células las que habitualmente se encuentran en el epitelio, vigilando posibles transformaciones de las células epiteliales.



## *Capítulo II*

*IELs TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>*

---



*Comparación de las poblaciones clonales CD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> de biopsias celíacas y no celíacas*

## **2.1 IELs expandidos a partir de mucosa celíaca y no celíaca. Análisis de clones TCR $\alpha\beta$ , CD8<sup>+</sup>, CD103<sup>+</sup>**

La identificación de un clon con fenotipo IEL TCR $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> (NEC44.25), nos llevó a analizar las características de células con este fenotipo en biopsias procedentes de enfermos celíacos y compararlas con las de biopsias control. Estos marcadores definen la población principal de IELs en la mucosa del intestino delgado. En este capítulo se presenta un estudio comparativo funcional sobre clones IEL aislados de dos biopsias celíacas (EC9 y EC41) y de una no celíaca (NEC40). La población total de linfocitos con el fenotipo CD8<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> en las diferentes biopsias fue del 76% en EC9, 33% en EC41 y 85% en NEC40 (**ver figura 0.1**).

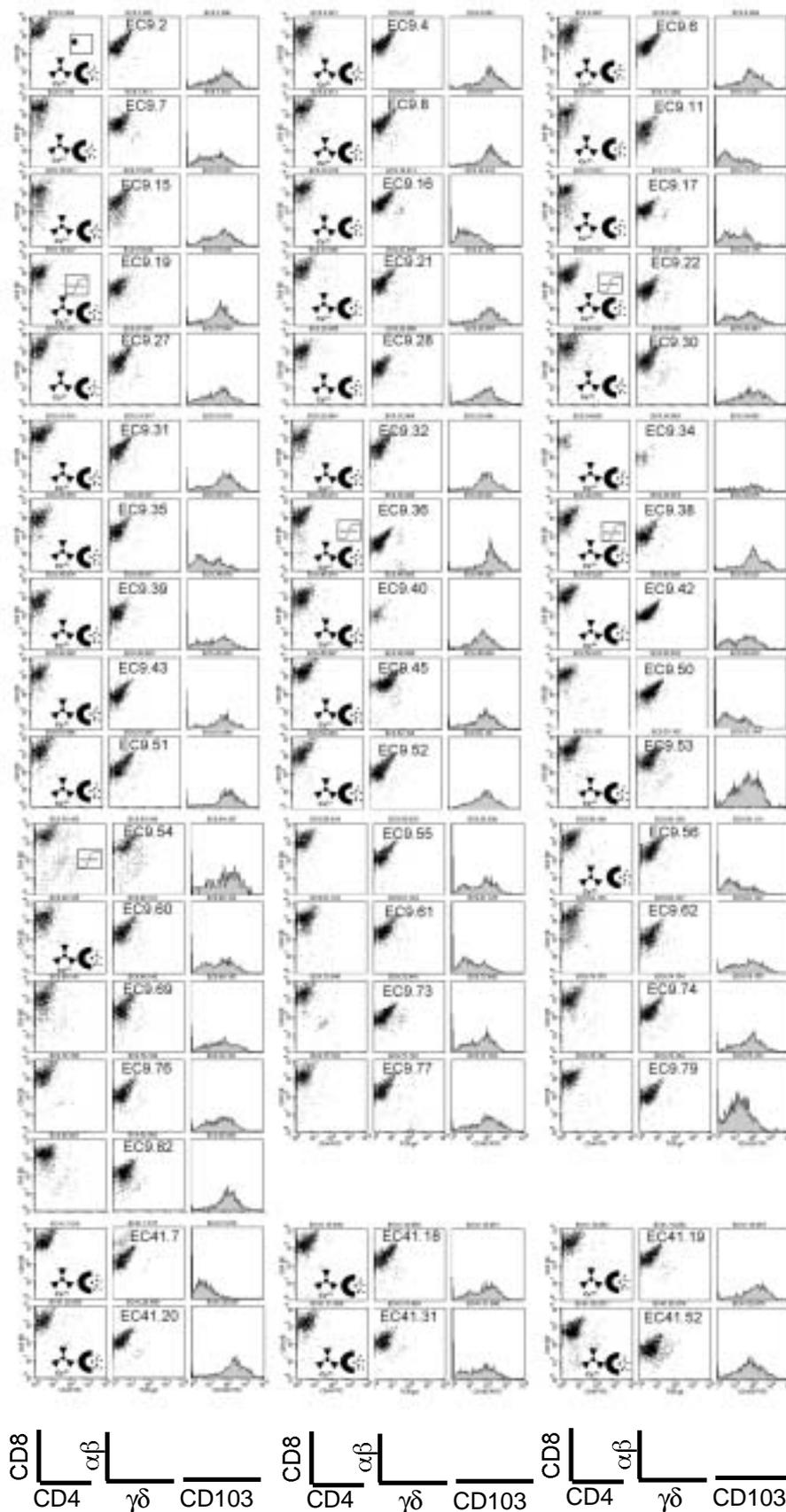
De las biopsias celíacas se aislaron un total de 49 clones (42 EC9 y 6 EC41) de los cuales sólo 1 (EC41.7) no expresaba CD103. De la biopsia NEC40 se aislaron 34 clones, todos con características de IELs. Todos los clones obtenidos procedían de placas en las que nunca se superó el 30% de pocillos con crecimiento. Sin embargo, la clonalidad no se confirmó, ya que no se hicieron subclonaje ni análisis del TCR. Las **figuras 2.1** y **2.2** muestran la expresión de CD8 y CD103 por los **83** clones y los diferentes estudios realizados sobre cada uno de ellos. Todos los clones analizados expresaron el dímero CD8 $\alpha\beta$  (datos no mostrados). Estos clones se expandieron con una buena tasa de replicación tras la estimulación con PHA-L. Se conservan más de 400 criotubos con clones TCR $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>, aislados de las biopsias EC9 y EC40.

### **2.1.1 Expresión de CD28 y CD94**

Para definir mejor el fenotipo de los clones, se examinó la expresión de CD94 y CD28, dos moléculas involucradas en la capacidad efectora de las células T. La determinación se realizó sobre un total de 25 clones EC (53%) y 17 (50%) clones NEC (**ver tabla 2.1**).

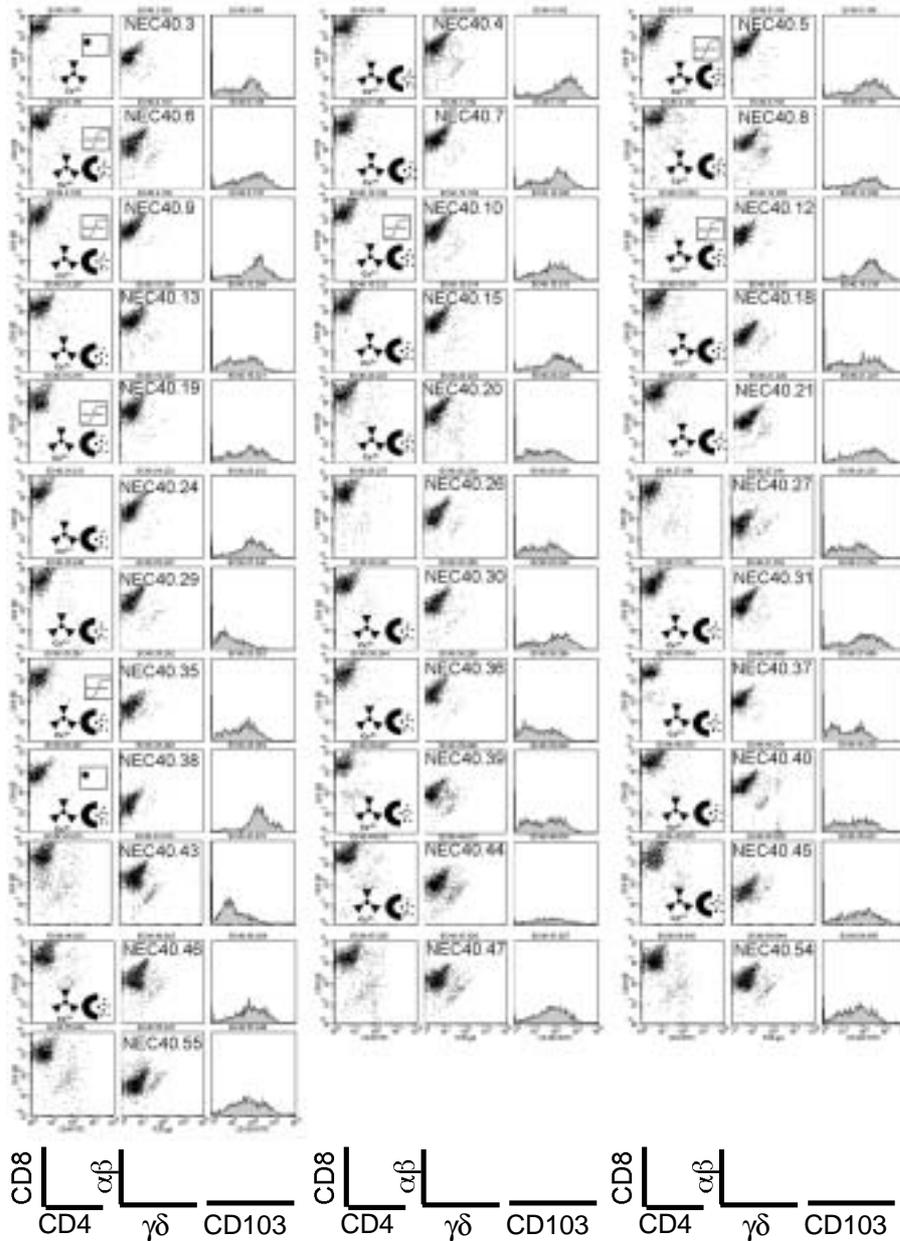
Se observaron tres patrones de tinción para CD94: negativo, positivo bajo y positivo alto. Once de 25 clones (44%) EC resultaron negativos, el mismo número de clones mostró una patrón de marcación débil y sólo 3 (12%) resultaron positivos. En los clones NEC, la distribución no difirió mucho de la observada en los clones EC: 6/17 negativos (35%), 8/17 débil o bajo (47%) y 3/17 positivos (17%). La **figura 2.3** muestra los patrones de expresión de CD94 en cuatro clones representativos (EC9.28, 9.15, 9.16 y NEC40.12). Estos resultados confirman diferentes patrones de expresión de esta molécula en IELs reportados en trabajos anteriores (147).

Respecto a la expresión de CD28, sólo 3 de 25 clones EC (12%) y 3 de los 17 clones NEC (17%) expresaron esta molécula encargada de transmitir la principal señal coestimuladora en los linfocitos T (**tabla 2.1**). Entre los pocos clones positivos la expresión resultó variable, con niveles muy altos como en el clon EC9.36 o intermedios como en el clon EC9.02 (**figura 2.4**). No se observaron diferencias entre los clones EC y NEC, resultando la mayoría de ellos negativos para la expresión de estos marcadores de superficie.

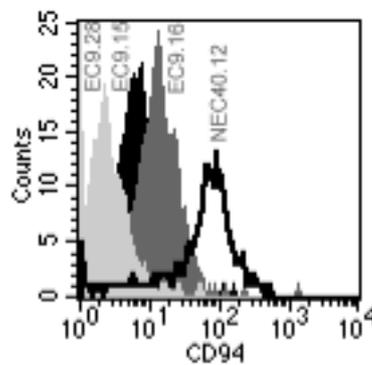


**Figura 2.1:** Expresión en superficie del TCR $\alpha\beta$ , el correceptor CD8 y la integrina CD103 en 43 clones aislados de la biopsia EC9 y 6 clones provenientes de la biopsia EC41. Los resultados de FACS se muestran como *dot-blots* (TCR y CD8) o histogramas (CD103). Las referencias insertadas en las figuras indican el estudio realizado sobre cada clon:

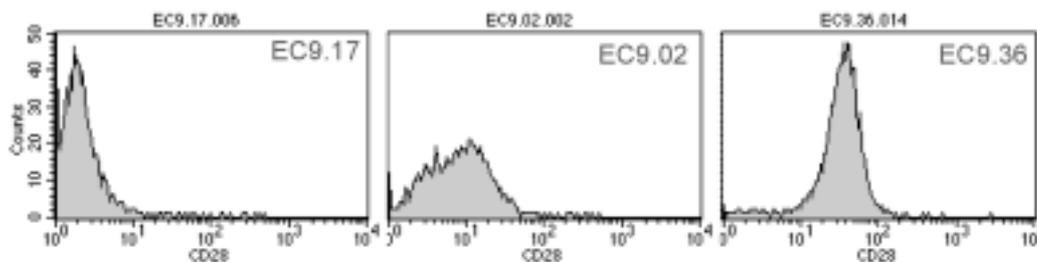
- Fenotipo; 
- citotoxicidad; 
- Citoquinas CBA; 
- Citoquinas Tiempo Real 



**Figura 2.2:** Expresión en superficie del TCR $\alpha\beta$ , el correceptor CD8 y la integrina CD103 en 34 clones aislados de la biopsia NEC40. Resultados expresados como en la figura 2.1.



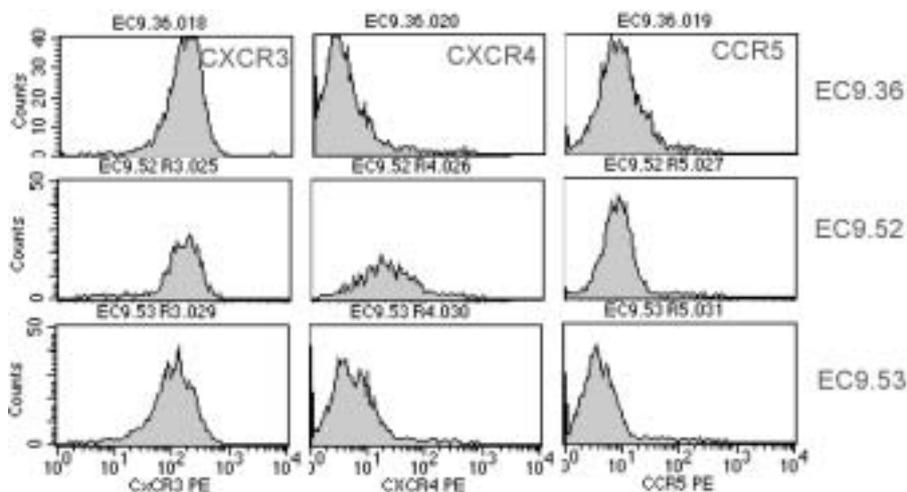
**Figura 2.3:** Expresión en superficie de la molécula CD94. Cada histograma muestra distintos niveles de expresión de CD94 en la membrana de 4 clones diferentes. Observamos tres patrones: Expresión nula (EC28, gris), baja (EC15 negro y EC16 gris oscuro) y alta (NEC40.12 línea negra).



**Figura 2.4:** Expresión en superficie de CD28 en los IELs. Se muestran un clon negativo (EC9.17), uno de expresión intermedia (EC9.02) y uno de alta expresión (EC9.36).

### 2.1.2 Receptores de quimiocinas: CXCR3, CXCR4 y CCR5

Se estudió la expresión de tres receptores de quimiocinas en 18 clones EC y en 17 clones NEC (**Tabla 2.1**). Un ejemplo de cada uno de los diferentes patrones de expresión de los tres receptores se muestra en la **figura 2.5**. Todos los clones expresaron altos niveles de CXCR3. De los 35 clones analizados, todos menos 4 carecían de expresión de CXCR4, 3 EC y uno NEC. La ausencia de expresión de CXCR4 en la mayoría de los clones analizados, contrasta con la expresión mayoritaria de este receptor en los IEL  $\gamma\delta$  (ver capítulo 4). La expresión de CCR5 fue positiva en 11 de 18 clones EC y en 9 de 17 clones NEC testados, pero de bajo nivel. No se observó diferencia alguna en la expresión de estos receptores entre los clones de biopsias celíacas y no celíacas.



**Figura 2.5:** Receptores de quimiocinas. Expresión de CXCR3, CCR5 y CXCR4 en tres clones (EC9.2, EC9.36 y EC40.46). Todos los clones expresan CXCR3. La expresión de CCR5 fue baja pero positiva en la mayoría de clones y con excepción de 4 clones, entre ellos el clon EC9.52 (en la figura), todos los clones fueron negativos para CXCR4.

En resumen, los clones CD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> aislados de las biopsias intestinales presentaban heterogeneidad en la expresión de moléculas de superficie relacionadas con la función celular, no observándose diferencias en los patrones de expresión entre celíacos y controles.

## 2.2 Patrón de citoquinas. Diferencias entre IELs aislados de biopsias celíacas y no celíacas

Para comparar las características funcionales de estas poblaciones con el clon IEL anteriormente descrito (ver capítulo 1), se analizó el patrón de citoquinas secretadas por 34 clones EC y 27 clones NEC. Los linfocitos T fueron estimulados *in vitro* con AcMo's anti-CD3 y anti-CD2, según el protocolo descrito para NEC44.25 y después de 48 h se determinó la cantidad de citoquinas liberadas al sobrenadante del cultivo. La cuantificación simultánea de seis citoquinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-4 e IL2) se realizó por citometría de flujo, mediante la técnica de CBA™ (figura 2.6). Las tablas 2.2 y 2.3 muestran los clones productores de cada una de las citoquinas analizadas. El punto de corte de secreción de cada citoquina se estableció de manera arbitraria alrededor del 10% del valor obtenido con los controles positivos, siempre por encima de los valores obtenidos con los controles negativos. Los clones con valores superiores a este punto de corte se consideraron secretores (tabla 2.1).

	EC (celíacos)			NEC (controles)			Cut off
		%	X $\pm$ STDEV (pg/ml)		%	X $\pm$ STDEV (pg/ml)	pg/ml
IFN- $\gamma$	33/34	97	70634 $\pm$ 31031	26/27	96	73092 $\pm$ 29406	20000
TNF- $\alpha$	23/34	67	3730 $\pm$ 6743	18/27	66	3139 $\pm$ 2969	1000
<b>IL-10</b>	<b>9/34</b>	<b>26</b>	<b>779 <math>\pm</math> 1044</b>	<b>17/27</b>	<b>62</b>	<b>1915 <math>\pm</math> 1950</b>	<b>500</b>
IL-5	4/34	12	417 $\pm$ 888	2/27	7	363 $\pm$ 1128	500
IL-4	7/34	20	113 $\pm$ 180	6/27	22	77 $\pm$ 198	100
<b>IL-2</b>	<b>15/34</b>	<b>44</b>	<b>1682 <math>\pm</math> 2040</b>	<b>7/27</b>	<b>26</b>	<b>720 <math>\pm</math> 916</b>	<b>1000</b>

**Tabla 2.1:** Valores medios de producción de citoquinas por clones EC y NEC

Clones Control	Grupo Lisis	IFN- $\gamma$	TNF $\alpha$	IL-10	IL-5	IL-4	IL-2	CD94	CD28	CXC R3	CXC R4	CC R5
40.05	I	+	-	+	-	-	-		-	+	+	+
40.09	I	+	+	+	-	-	-	+/-	-			
40.31	I	+	+	+	-	+	-	-	-			
40.29	I	+	+	-	-	-	-	-	-			
40.04	I	+	-	-	-	-	-	+/-	+			
40.21	I	+	-	-	-	-	-		-	+	-	+
40.15	II	+	+	+	-	-	-		-	+	-	+/-
40.13	II	+	+	+	-	-	+		-	+	-	-
40.20	II	+	+	+	-	-	+		+	+	-	+/-
40.10	II	+	+	+	-	+	-	+	-			
40.36	II	+	-	-	-	-	-	+/-	+			
40.07	III	+	+	+	-	-	-		-	+	-	-
40.24	III	+	+	+	-	-	-		-	+	-	+
40.06	III	+	-	+	-	-	-	+/-	-			
40.46	III	+	+	+	-	-	+	+/-	-	+	-	++
40.44	III	+	-	+	-	+	-		-	+	-	-
40.12	III	+	+	-	-	-	-	++	+			
40.35	III	+	+	-	-	-	+		-			
40.37	III	+	+	-	-	-	-		+	+	-	-
40.40	III	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-
40.03	III											
40.19	IV	-	-	+	-	-	-	-	-			
40.30	IV	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
40.39	IV	+	+	+	-	-	-	+/-	-	+	-	-
40.45	IV	+	-	+	-	-	-	+/-	-	+	-	-
40.38	IV	+	+	+	-	-	+		-	+	-	-
40.18	IV	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
40.08	IV	+	-	-	-	-	-	+/-	-	+	-	+

**Tabla 2.2** Clones CONTROL CD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>. Fenotipo funcional de clones T  $\alpha\beta$  aislados de mucosa intestinal. En la segunda columna, la clasificación según la reactividad frente a células epiteliales: grupos I (alto), II (reactivos frente a CaCo2), III (tipo NK) y IV (no reactivos). Sombreado en gris oscuro (+) los clones positivos para la expresión de cada proteína, en gris claro (+/-), niveles medios de expresión y sin resaltar (-) los clones negativos. Las casillas en blanco significan que no se ha estudiado.

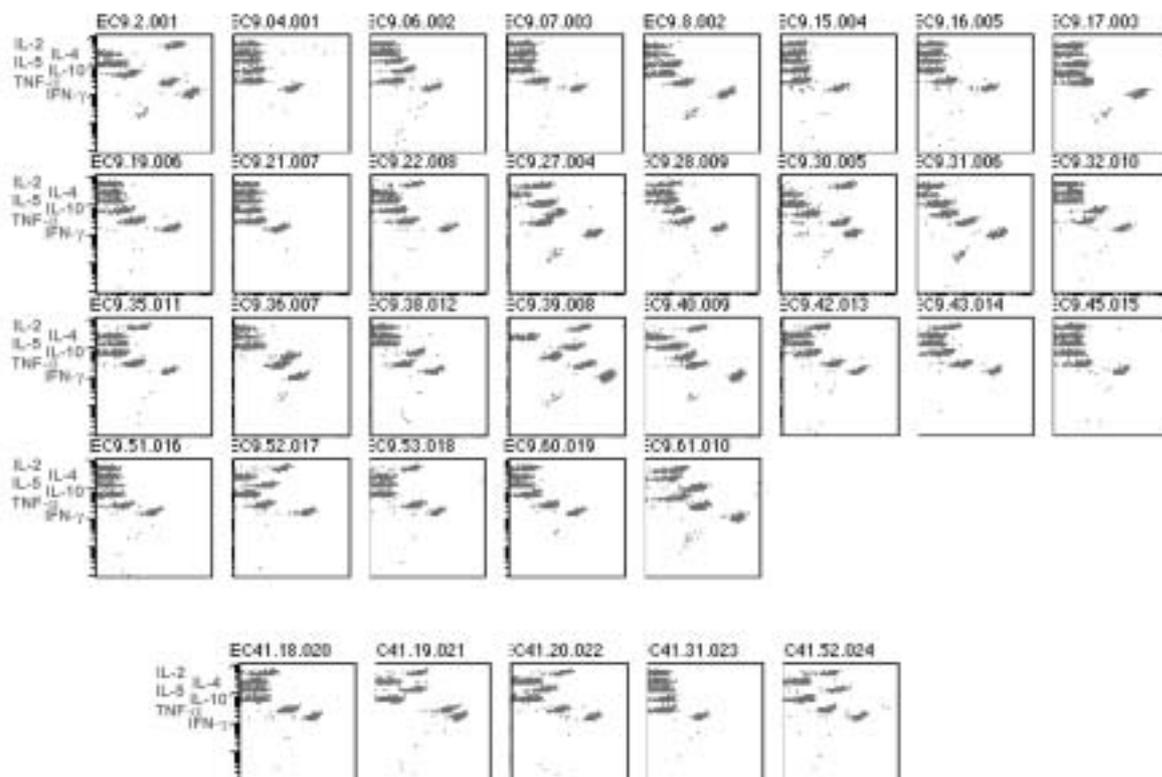
Clones Celiaco	Grupo Lisis	IFN- $\gamma$	TNF $\alpha$	IL-10	IL-5	IL-4	IL-2	CD94	CD28	CXC R3	CXC R4	CC R5
9.40	I	+	+	+	-	+	+	+/-	-	+	-	+/-
9.42	I	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
9.43	I	+	+	-	-	-	+	+/-	-	-	-	-
9.53	I	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
41.18	I	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
41.19	I	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
41.52	I	+	+	-	+	-	+	+/-	-	-	-	-
9.61	I	+	+	-	+	+	-	+/-	-	+	-	+/-
9.45	I	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
9.51	I	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9.21	I	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+/-	-
9.16	II	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
9.22	II	+	+	-	-	-	+	+/-	-	-	-	-
9.8	II	+	-	-	-	-	-	+/-	-	+	-	-
9.17	II	+	-	-	-	+	-	+/-	-	+	-	+
9.11	II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9.31	III	+	+	+	-	-	-	+/-	-	+	-	+/-
9.27	III	+	-	+	-	-	-	+/-	-	+	-	+
9.6	III	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9.28	III	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
9.52	III	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+/-
9.19	III	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9.2	III	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+
9.7	III	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-
9.60	III	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
9.4	III	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9.39	III	+	+	+	+	+	+	+/-	-	+	-	+/-
9.32	IV	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
9.38	IV	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9.36	IV	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+/-
9.35	IV	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
9.30	IV	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+
41.20	IV	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
41.31	IV	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9.15	IV	+	-	-	-	-	-	+/-	-	+	+/-	+
9.34	IV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabla 2.3.** Clones CELIACOS CD8<sup>+</sup>, CD103<sup>+</sup>. Los resultados están expresados como en la Tabla 2.1

Clones CONTROL (NEC)



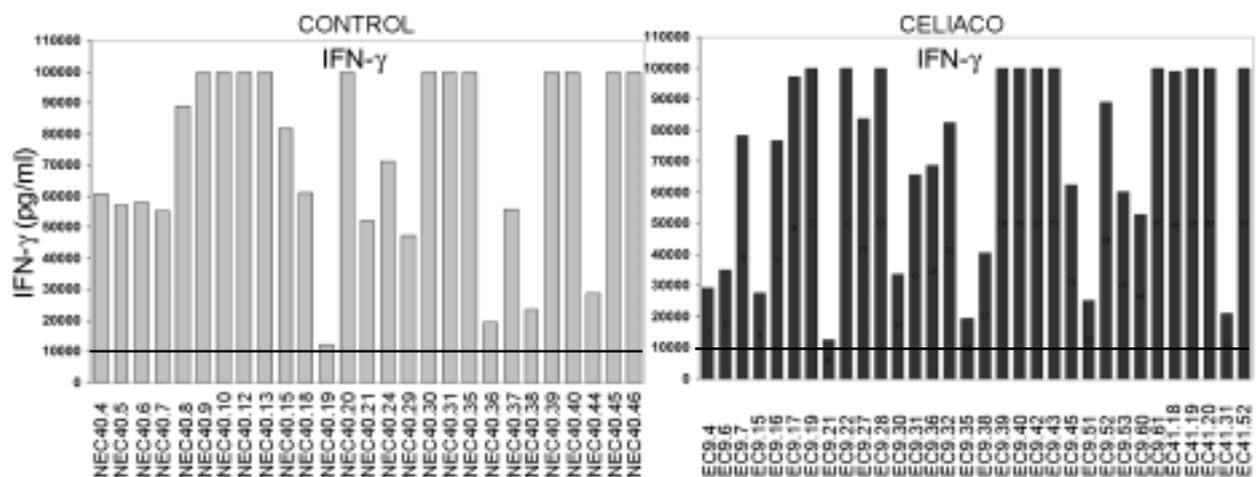
Clones CELIACOS (EC)



FL2-Intensidad Fluorescencia

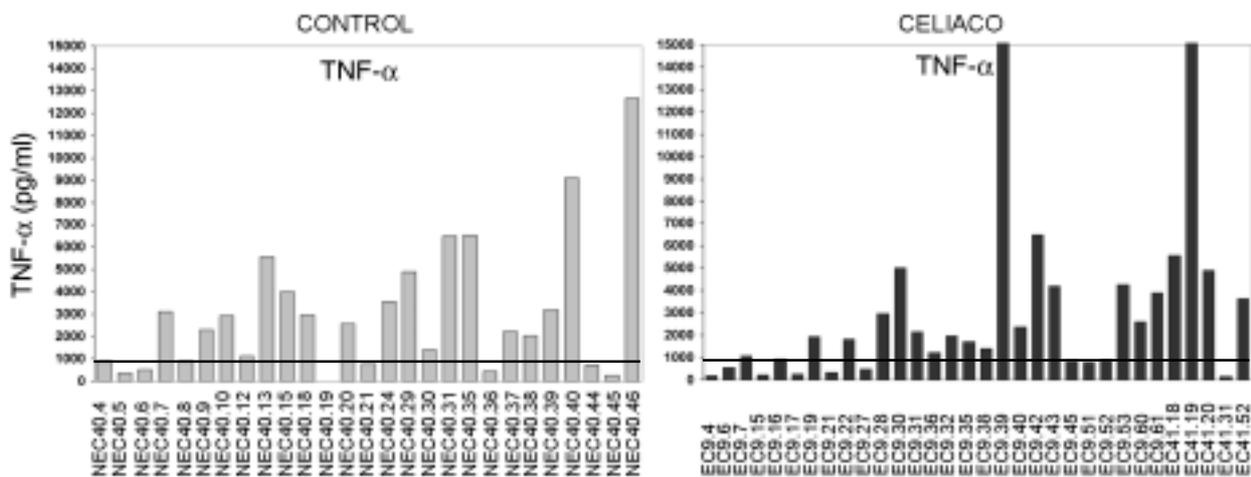
**Figura 2.6:** Patrón de secreción de citoquinas producidas por los clones T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup>. La determinación de citoquinas por CBA™ se realizó en sobrenadantes (dil:1:20) de células T estimuladas 48 h con AcMo anti-CD3 (OKT3) y anti-CD2 (204-12). Cada figura representa el patrón de secreción de 1 clon después de la estimulación. Los puntos desplazados hacia la derecha representan secreción positiva. La lista de las citoquinas a las que corresponde cada *dot blot* se muestran a la izquierda de la figura. La intensidad de fluorescencia en FL-2 representa la cantidad de citoquina en cada sobrenadante.

Como se esperaba para este tipo de IELs CD8 $^+$ , casi todos los clones T produjeron altos niveles de IFN- $\gamma$  (**figura 2.7**). La producción media de IFN- $\gamma$  por 50.000 células estimuladas en 100  $\mu$ l de volumen de medio de cultivo, fue de 70.634 y 73.092 pg/ml en clones EC y NEC, respectivamente. Por lo tanto, no había diferencia en la producción de IFN- $\gamma$  entre las dos poblaciones de clones IEL. Los datos también demostraron que en las mismas condiciones de estimulación, los linfocitos T  $\alpha\beta$  CD8 $^+$  producen significativamente más IFN- $\gamma$  que los IELs  $\gamma\delta$ , cuya producción media fue de 26.000 pg/ml (ver Capítulo 4).



**Figura 2.7:** Cuantificación de la producción de IFN- $\gamma$  por los clones TCR $\alpha\beta$  CD8 $^+$ , realizada por CBA. Los resultados muestran alta expresión de IFN- $\gamma$  en todos los clones, tanto en los EC como NEC. La línea indica el nivel mínimo tomado para considerar un clon productor. En ambos casos, el 96 % de los clones produjo IFN- $\gamma$  por encima de los 10.000 pg/ml. El análisis estadístico confirmó que no había diferencias entre las dos poblaciones de clones estudiados ( $x \pm \text{STDEV}$ , EC: 70634 $\pm$ 31031 pg/ml, NEC: 73092 $\pm$ 29406 pg/ml,  $p=0,7563$ ).

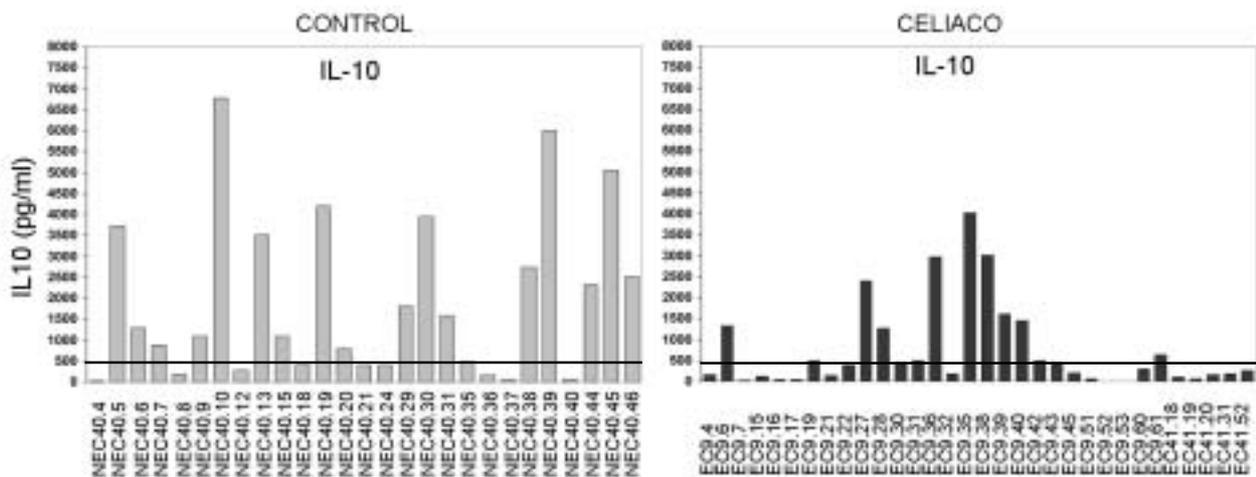
La citoquina pro-inflamatoria TNF- $\alpha$  se detectó en el sobrenadante de un alto número de clones (**figura 2.8**), aunque a niveles menores que el IFN- $\gamma$ . Considerando como positivos aquellos clones con una producción superior a 1000 pg/ml, el porcentaje de clones productores de esta citoquina fue cercano al 70 % tanto en clones EC (67%) como en clones NEC (66%). La producción media fue respectivamente de 3.730 pg/ml y 3.139 pg/ml.



**Figura 2.8:** Cuantificación de la producción de TNF- $\alpha$  realizada por CBA. Los histogramas indican que el 67 % de los clones produjo por encima de los 1.000 pg/ml. La media de producción de los clones fue de 3.730 pg/ml para los EC y de 3.139 para las NEC. El análisis estadístico no mostró diferencias entre estas poblaciones ( $X \pm STDEV$ , EC:  $3.730 \pm 6.743$  pg/ml, NEC:  $3.139 \pm 2.969$  pg/ml,  $p = 0,6581$ ).

### 2.2.1 Diferencias en la producción de IL-10 e IL-2

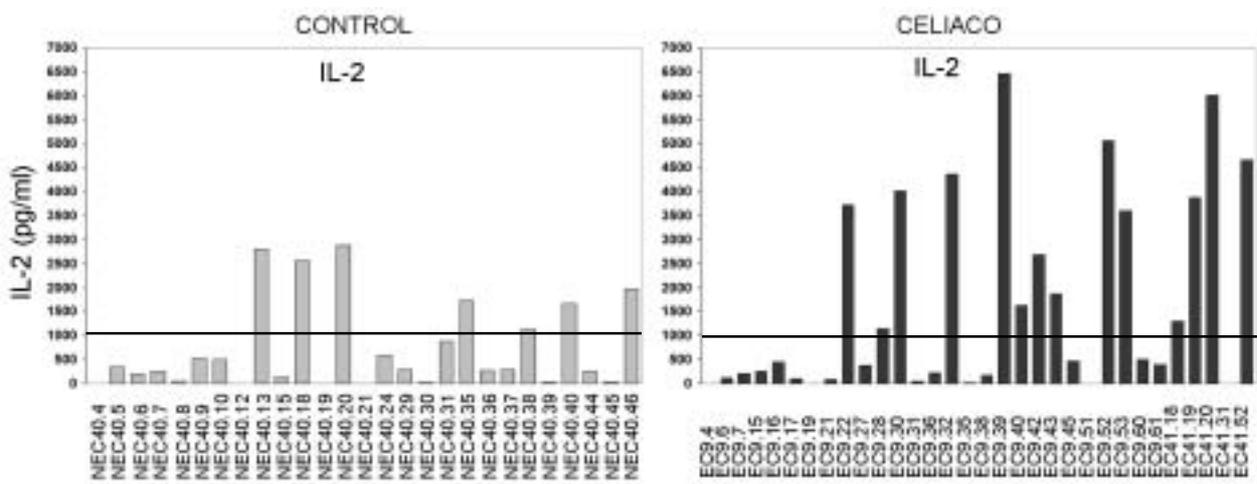
La cuantificación de la secreción de IL-10 reveló datos interesantes. Encontramos que un mayor número de clones T del donante no celiaco (17/27, 62%) sintetizaron IL-10, a una concentración superior a los 500 pg/ml, con una media cercana a los 1.915 pg/ml (**figura 2.9**). Por el contrario, sólo el 26% (9/34) de los clones T provenientes de las biopsias celíacas produjeron IL-10, con una media cercana a los 779 pg/ml. Las diferencias entre las dos poblaciones fue significativa (t student,  $p < 0,0103$ ).



**Figura 2.9:** Cuantificación de la producción de IL-10 realizada por CBA. Las gráficas muestran las diferencias en el porcentaje de clones productores de IL-10. Un 62 % de los clones NEC produjeron esta citoquina contra el 26% de los clones EC. La media de producción de IL-10 por los clones NEC también fue superior (1915 pg/ml para los NEC y de 779 para las EC). ( $X \pm STDEV$ , EC:  $779 \pm 1044$  pg/ml, NEC:  $1915 \pm 1950$  pg/ml,  $p = 0,0103$ ).

El análisis de expresión de IL-2 por los clones mostró resultados opuestos a los de IL-10. Quince de los 34 clones EC (44%) sintetizaron IL-2 por encima de los 1.000 pg/ml, con una concentración media superior a 1.682 pg/ml (**figura 2.10**). De los clones NEC, sólo el 25 % superó el umbral de los 1.000 pg/ml, con una concentración media de todos los clones de 720 pg/ml. Igual que con IL-10, las diferencias entre las dos poblaciones fueron significativas (t student,  $p < 0,0208$ ).

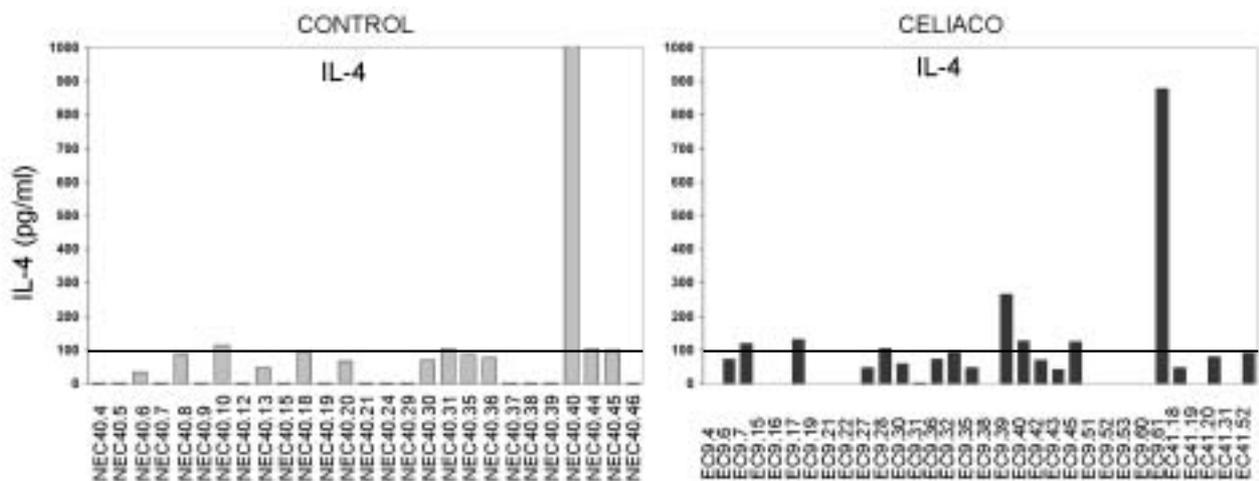
Considerando los clones productores de IL-10 y/o IL-2 (40 clones), sólo siete (17%) produjeron ambas citoquinas (EC9.40, 9.28, 9.39 y NEC40.13, 40.20, 40.38 y 40.46) (**tablas 2.1 y 2.2**). Esto indicaría una tendencia hacia la producción de una u otra citoquina en las células CD8<sup>+</sup> del epitelio (ver discusión). El único clon que expresaba bajos niveles de IFN- $\gamma$  (NEC40.19) sólo produjo IL-10 y ninguna otra citoquina de las analizadas.



**Figura 2.10:** Cuantificación de la producción de IL-2 realizada por CBA. Las diferencias entre las poblaciones de EC y NEC en el número de clones positivos y en la producción media de IL-2 fueron significativas, con una producción superior entre los clones procedentes de biopsias celíacas ( $X \pm STDEV$ , EC:  $1682 \pm 2040$  pg/ml, NEC:  $720 \pm 916$  pg/ml,  $p = 0,0208$ )

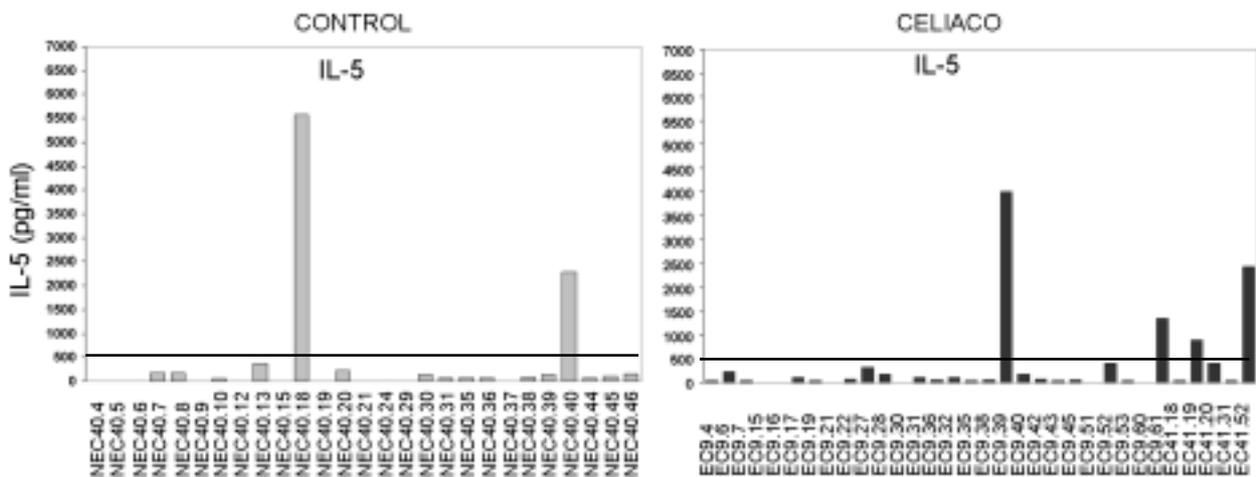
### 2.2.2 Síntesis de IL-4 e IL-5: no hay diferencias

La determinación de IL-4 mostró resultados similares entre ambos grupos (EC vs NEC) (**figura 2.11**). Con el umbral de positividad situado en los 100 pg/ml, el porcentaje de clones productores de IL-4 fue del 20% para los clones EC y de 22 % para los NEC. La concentración media se situó cercana a los 100 pg/ml en ambos grupos. Dos clones (EC9.61 y NEC40.40) secretaron IL-4 por encima de los 800 pg/ml. Como control positivo de síntesis de IL-4 se utilizó el clon CD8<sup>+</sup> TCR  $\alpha\beta$  de lamina propia, EC21.21 (ver capítulo 3), con una producción de 460 pg/ml.



**Figura 2.11:** Cuantificación de la producción de IL-4 realizada por CBA ( $X \pm STDEV$ , EC:  $113 \pm 180$  pg/ml, NEC:  $77 \pm 198$  pg/ml,  $p = 0,5065$ ).

La IL-5 tampoco reveló diferencias significativas en el porcentaje de clones productores, ni en la síntesis media (**figura 2.12**). El punto de corte en este caso se estableció en los 500 pg/ml y el porcentaje de positividad se situó sobre el 12 % en los clones EC (417 pg/ml) y en 7 % en los clones NEC (363 pg/ml).



**Figura 2.12:** Cuantificación de la producción de IL-5 realizada por CBA. ( $X \pm STDEV$ , EC:  $417 \pm 888$  pg/ml, NEC:  $363 \pm 1128$  pg/ml,  $p = 0,8462$ ).

La **tabla 2.4** muestra un resumen de estos resultados, señalando el número de clones que diferencialmente expresaron una de las citoquinas (IL-10, IL-2, IL-4 o IL-5), además de la expresión por defecto de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . IL-10 se expresó preferentemente en clones NEC (37% NEC vs 17% EC), mientras que la tendencia era opuesta para IL-2 (30% EC vs 4% NEC). La producción de IL-4 se limitó a 3 clones EC (9%) y ninguno de los no celíacos. No se observaron diferencias en la expresión de IL-5. La **tabla 2.5** muestra los valores medios (X) de producción de cada una de las citoquinas para todos los clones, con los desvíos estándar (STDEV) y la comparación por el t de Student's (se consideran diferencias significativas si  $p < 0.05$ ). Como se mostró anteriormente, esta forma de análisis también dió diferencias significativas entre las células de biopsias EC y NEC para IL-10 e IL-2.

	EC (celíacos)		NEC (controles)	
		%		%
IL-10	6/34	17	10/27	37
IL-2	10/34	30	1/27	4
IL-4	3/34	9	0/27	0
IL-5	0/34	0	0/27	0
IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$	8/34	23	7/27	26

**Tabla 2.4:** Número de clones que expresan diferencialmente IL-10, IL-2, IL-4 o IL-5, además de IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$ .

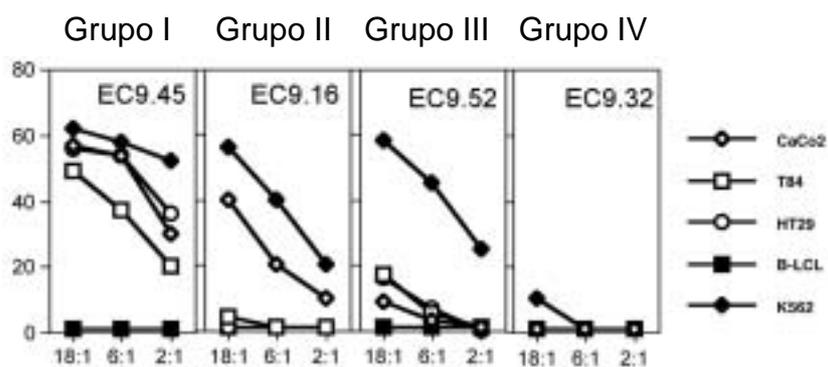
	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-10	IL-5	IL-4	IL-2
MEAN 1 (NEC)	73092	3139	1915	363	77	720
MEAN 2 (EC)	70634	3730	779	417	113	1682
T TEST P=	0,7563	0,6581	<b>0,0103</b>	0,8462	0,5065	<b>0,0208</b>
STDEV 1	29406,84	2969,06	1950,86	1128,69	198,91	916,14
STDEV 2	31031,29	6743,13	1044,93	888,38	180,90	2040,49

**Tabla 2.5:** Valores medios de la producción de citoquinas por los grupos de clones EC y NEC.

### **2.3 Reactividad frente a líneas epiteliales. Tres patrones diferentes**

Para definir la capacidad funcional de este grupo de IELs, realizamos ensayos de citotoxicidad frente a tres líneas de células epiteliales, una B-LCL y K562. Esto nos permitiría determinar si las características funcionales de estas células se correspondía con las descritas con el clon T intraepitelial NEC44.25.

Estudiamos el 76 % de los clones EC (36/47) y el 82 % de los NEC (28/34). En ambos grupos diferenciamos cuatro patrones de reactividad (**figura 2.13**). El primero, un grupo con *alta* reactividad (*grupo I*), con un porcentaje de lisis comprendido entre 20-60% a una relación E:T de 6:1; el segundo (*grupo II*) de bajo nivel citotóxico, por debajo del 10% a la misma relación E:T pero que lisaba la línea CaCo2 con mayor eficiencia que las demás, además de K562; un tercer grupo, constituido por 10 clones NEC40 y 10 EC9, no lisaban las células epiteliales pero mantenía la reactividad NK (*grupo III*). Sólo 7 de los clones NEC40 y 6 de los clones EC9 carecían de capacidad citotóxica sobre cualquiera de las dianas estudiadas (*grupo IV*).



**Figura 2.13:** Patrones de citotoxicidad sobre distintas dianas. Los clones EC9.45, EC9.16, EC9.52 y EC9.32 representan los grupos I, II, III y IV, respectivamente.

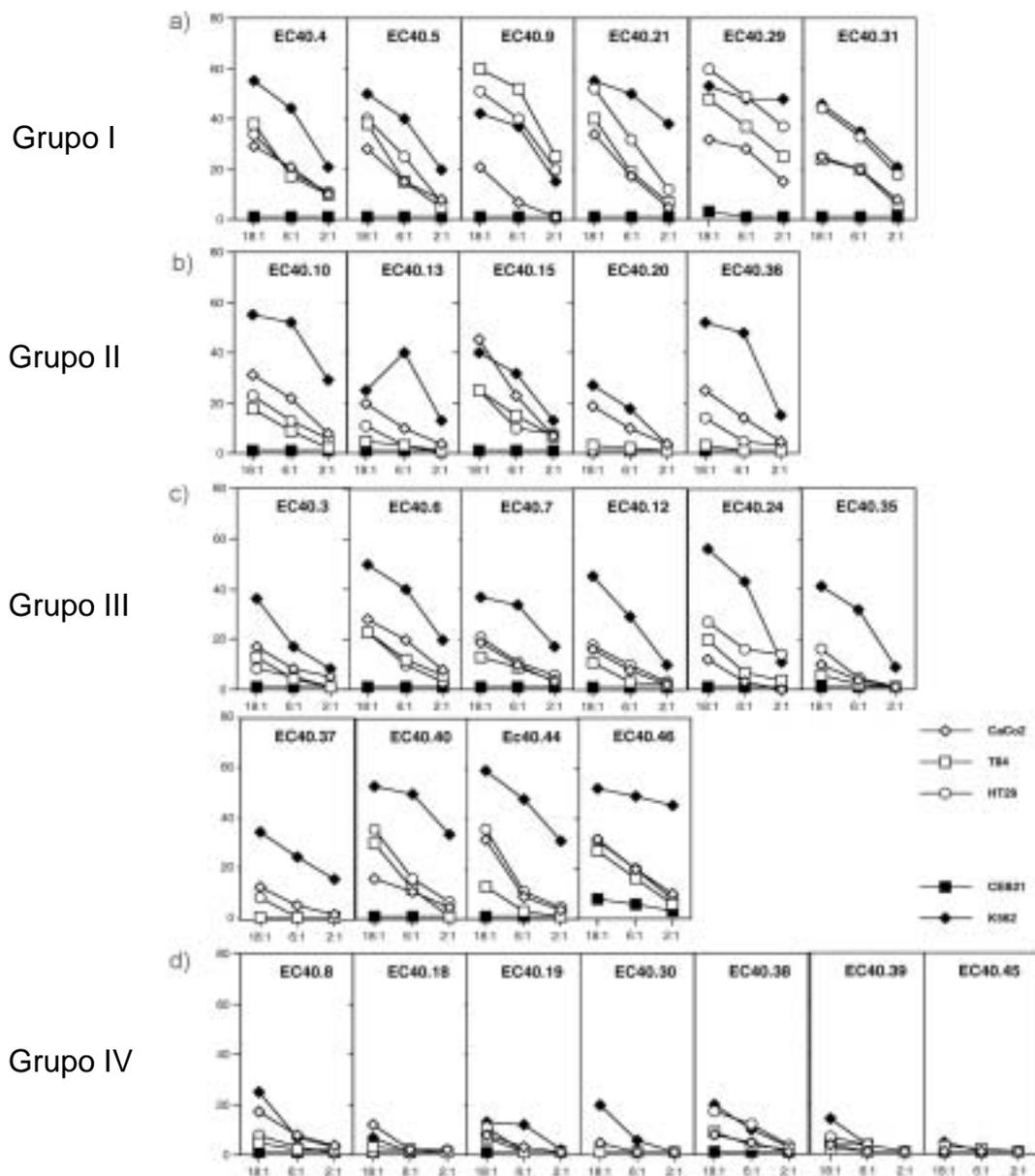
### 2.3.1 Distribución de los patrones de citotoxicidad entre los clones NEC y EC

Entre los clones de la biopsia control, 6 de los 28 (NEC40.4, 40.5, 40.9, 40.21, 40.29, 40.31) pertenecían al grupo I (**figura 2.14a**). Consideramos que en estos clones la lisis de las tres líneas era muy semejante, a excepción de EC40.9 en la que Caco2 era lisada menos eficientemente que las otras dianas. Por lo tanto, este grupo de clones mostraban un patrón de citotoxicidad semejante al observado con el clon NEC44.25 (Capítulo 1).

Cinco clones (NEC40.10, 40.13, 40.15, 40.20 y 40.36), pertenecientes al grupo II, tenían como característica común el reconocimiento más eficiente de Caco2 (**figura 2.14b**). Un patrón similar se observó posteriormente en clones de lámina propia CD8<sup>+</sup>Vα2, expandidos de la biopsia EC21 (ver Capítulo 3).

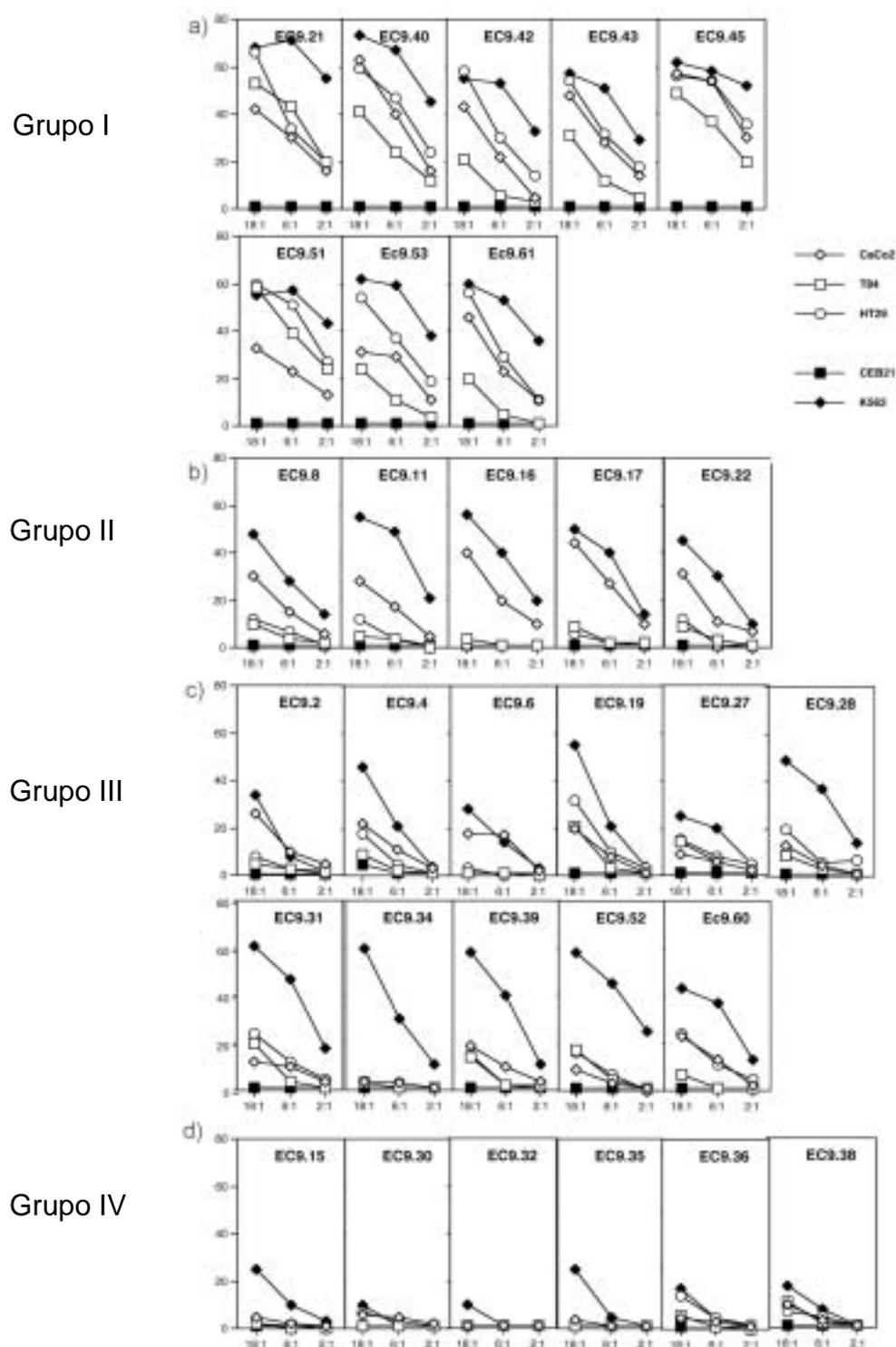
Otros 10 clones (NEC40.3, 40.6, 40.7, 40.12, 40.24, 40.35, 40.37, 40.40, 40.44, 40.46) pertenecían al grupo III, con una reactividad por debajo del 20 % de lisis a una relación de 6:1, pero con actividad citotóxica frente a K562 (**figura 14c**).

Por último, en el grupo IV se incluyeron 7 clones (NEC40.8, 40.18, 40.19, 40.30, 40.36, 40.39 y 40.45) que carecían de reactividad citotóxica (**figura 14d**).



**Figura 2.14:** Actividad citotóxica de los clones NEC, correspondientes a los grupos de reactividad definidos: 6 clones del grupo I, 5 del grupo II, 10 del grupo III y 7 del grupo IV.

Los mismos patrones se observaron en los clones aislados a partir de la biopsia celíaca. Once del grupo I (EC9.21, EC9.40, EC9.42, EC9.43, EC9.45, EC9.51, EC9.53, EC9.61 y EC41.18, 41.19 y 41.52), 5 del grupo II (EC9.8, 9.11, 9.16, 9.17, 9.22), 12 del grupo III (EC9.2, 9.4, 9.6, 9.7, 9.19, 9.27, 9.28, 9.31, 9.39, 9.52, 9.60) y 8 no citotóxicos (EC9.15, 9.30, 9.32, 9.35, 9.36, 9.38, 41.20 y 41.31). Los resultados de clones procedentes de la biopsia EC9 se muestran en la **figura 2.15**.

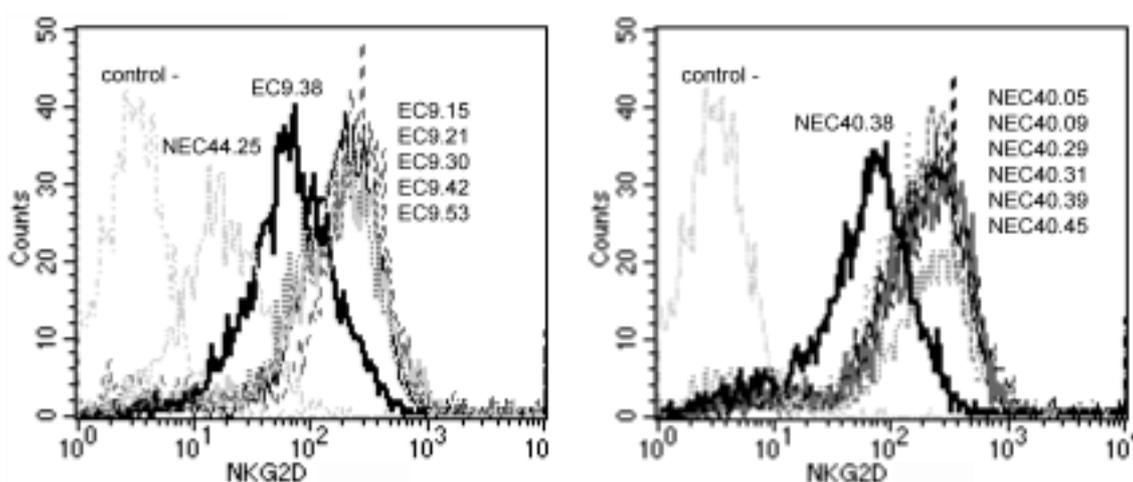


**Figura 2.15:** Actividad citotóxica de los clones EC, correspondientes a los grupos de reactividad definidos: 8 clones del grupo I, 5 del grupo II, 11 del grupo III y 6 del grupo IV.

## 2.4 Citotoxicidad, receptores NK y citoquinas

La expresión de NKG2D se determinó en siete clones del grupo I, 4 controles (NEC40.5, 9, 29 y 31) y tres celíacos (EC9.21, 42 y 53) y en seis clones del grupo IV, tres controles (NEC40.38, 39 y 45) y tres celíacos (EC9.15, 30 y 38) (**figura 2.16**). Si bien dos de los seis clones del cuarto grupo (EC9.38 y NEC40.38), expresaron niveles de NKG2D más bajos, no se observaron diferencias entre el resto de los clones. Es decir que las diferencias en los patrones de reactividad no se deben a alteraciones en la expresión de este receptor activador. Más aún, los niveles de expresión de NKG2D en el clon NEC44.25, de alta reactividad epitelial, fueron comparativamente inferiores. Sin embargo, no podemos descartar que las diferencias en la actividad citotóxica observada se deban a bajos niveles de expresión del adaptador DAP10 (ver discusión).

Tampoco se pudo asociar la expresión de CD94 con un patrón de citotoxicidad ya que esta molécula se expresaba en células de todos los grupos.



**Figura 2.16:** Expresión de NKG2D en siete clones control NEC40.5, 9, 29, 31, 38, 39 y 45 (izquierda) y seis celíacos (EC9.15, 21, 30, 38, 42 y 53) (derecha). NEC44.25, como control de expresión positiva (izquierda). Anticuerpo secundario marcado con PE .

En resumen, no se observaron diferencias en la distribución de los patrones de reactividad entre las dos series de clones, aunque había más clones de alta reactividad (grupo I) entre los celíacos. Los resultados sugieren principalmente la existencia de al menos dos ligandos epiteliales diferentes, correspondientes a los patrones I y II, uno de ellos específico de las células Caco2. Estos dos ligandos serían reconocidos tanto por clones EC como NEC. El grupo III presentó características de células tipo NK, y el grupo IV, en que no se observó reactividad frente a las dianas estudiadas, podría corresponder a una población sin capacidad citotóxica o bien a una población antígeno específica convencional. Las diferencias observadas anteriormente en el patrón de citoquinas, eran más evidentes entre los clones del grupo I, en el cual ninguno de los NEC producían IL-2 y sólo uno de los EC (9.40) producía IL-10. Sin embargo, la tendencia se mantenía entre los otros grupos, sobre todo el mayor número de clones productores de IL-10 entre los procedentes de biopsias no celíacas.



*Discusión II*

---



En este capítulo hemos comparado algunas de las características fenotípicas y funcionales de 64 clones T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>, aislados de dos biopsias celíacas y de una biopsia no patológica.

Esta población expresa la forma alfa-beta del correceptor CD8 y se corresponde con la mayoritaria en el epitelio intestinal humano. Por el contrario, en el ratón, los IEL  $\alpha\beta$  son menos abundantes que los  $\gamma\delta$  y generalmente expresan CD8 $\alpha\alpha$  (tabla 1, página 38). El bajo número de clones CD28<sup>+</sup> (12% en EC y 17% en NEC) aislados concuerda con los datos de otros autores en tinciones *in situ* (97,142). Se desconoce cuál es la función del CD28 en estas células, que *in situ* no sería la de coestimular a los IELs ya que las células epiteliales del intestino delgado carecen de la expresión de los coligandos de CD28 (135). Las células CD28<sup>+</sup> podrían interactuar con células dendríticas o macrófagos presentes en la LP. Las líneas HT29 y T84 expresan CD80 y CD86 (datos no mostrados) al igual que los enterocitos de colon (224). Evidentemente la expresión diferencial de CD28 agrega un dato más a la heterogeneidad de las células T de la mucosa intestinal, aunque no hay diferencias en la expresión de CD28 entre los clones aislados de biopsias celíacas y no celíacas. Hasta el momento no se ha determinado la funcionalidad de esta proteína en los IELs CD8<sup>+</sup>.

El aumento en la expresión de CD94 en IELs se asocia con la enfermedad celíaca (147). El porcentaje de IELs CD94<sup>+</sup> en biopsias control es cercana al 27% incrementándose en EC hasta un 75%. Este aumento de CD94 va acompañado de una disminución de la forma inhibitoria (CD94/NKG2A). En nuestro análisis, encontramos un alto porcentaje de clones CD94<sup>+</sup> (EC: 65%, NEC, 56 %). La falta de diferencias en la expresión de CD94 entre clones EC y NEC, indicaría que el aumento de esta proteína en IELs celíacos se induciría *in situ*, posiblemente como consecuencia de la expresión de IL-15 (147). Si bien no determinamos la expresión de NKG2A, observamos un bajo número de clones con altos niveles de CD94 (EC,12% y NEC,17%) sin relación con su capacidad citotóxica. Esto se podría relacionar con un menor número de clones NKG2A positivos en ambas muestras.

Como se ha mencionado en la introducción, los estudios de producción de citoquinas en IELs totales son escasos. Posiblemente estos sean los primeros datos sobre producción de citoquinas por clones de IELs estimulados *in vitro*. Los IELs de mucosa normal (141) y celíaca producen IFN- $\gamma$  (80,225). El análisis clonal que hemos realizado de estos IELs confirman que la producción IFN- $\gamma$  es común de todos los linfocitos T. Por otra parte, la producción de TNF- $\alpha$  se detectó en casi un 70% de los clones de ambos tipos de muestras. La expresión del mRNA para TNF- $\alpha$  se había demostrado previamente en IELs (80,154) y clones de LPL específicos de gluten (88). Esta expresión de TNF- $\alpha$  se ha relacionado con la regulación de la transglutaminasa (TG) (17), importante en celiaquía. En ratón, las dos citocinas tienen un efecto sobre la inducción de muerte de células epiteliales y la renovación del epitelio intestinal (223). Estos efectos son dependientes de la presencia de IELs y se incrementan tras inyecciones sistémicas de IL-12. *In vitro* se ha visto que el IFN- $\gamma$  por sí sólo es capaz de alterar las uniones estrechas entre enterocitos ("tight junctions"), lo que agregado a la inducción de perforina, FAS-L y TNF- $\alpha$  por la IL-12 incrementa la muerte y la renovación de las células epiteliales. El patrón similar de producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  entre los clones de EC y NEC sugeriría más un papel relacionado con la renovación del epitelio que un

papel patológico *per se*, aunque esto último no se puede descartar. En el colon estas citoquinas estarían actuando de manera diferente, ya que no producen dichas alteraciones en el epitelio.

Las diferencias más importantes se observaron en la producción de IL-10 e IL-2. Mientras en los no celíacos, el 62% de los IELs CD8<sup>+</sup> sintetizaban IL-10, sólo el 26 % de los aislados de biopsias celíacas producían esta citoquina. Además, los clones no celíacos producían una concentración media más alta de IL-10 que los de biopsias celíacas. De acuerdo con nuestros resultados, un estudio comparativo realizado sobre PBL de una veintena de pacientes EC y controles, mostraba que los linfocitos T de celíacos producían menos IL-10 que los de individuos sanos, tras su activación policlonal (226). Esta regulación negativa de la secreción de IL-10 la atribuían a un posible defecto genético relacionado con la enfermedad. Sin embargo, Forsberg y col encontraron un incremento en la síntesis de mRNA de IL-10 en IELs aislados de mucosa celíaca, que atribuyeron a una pequeña población de células T con alta actividad de transcripción, ya que el número de células productoras *in situ* no estaba aumentado (80).

La producción de IL-10 por los IELs CD8<sup>+</sup>, podría tener un papel fundamental en la regulación de la respuesta inmune *in situ*. Se sabe que ratones KO que no expresan IL-10 desarrollan colitis, debido a una desregulación del sistema que favorece la respuesta Th1 (75). La actividad anti-Th1 de la IL-10 incluye la capacidad de inducir la transcripción de inhibidores de las metaloproteinasas, involucradas en la desestructuración del epitelio en EC (227). Una reducción en la producción de IL-10 podría estar asociada con la imposibilidad de controlar la enfermedad. También se ha demostrado que ratones que no producen PGE2 (metabolito derivado del ácido araquidónico dependiente de COX-2), inductor de IL-10, pueden desarrollar un daño en la mucosa, similar al producido en la EC (40). Queda por determinar si los IELs productores de IL-10 se comportarían de manera semejante a las CD4<sup>+</sup> Tr1 descritas en ratón (65). Muchos de los clones comparten con las Tr1 la propiedad de no producir ni IL-2 ni IL-4. El número de clones con este fenotipo (IFN- $\gamma$ +, IL-10+, IL-2-, IL-4-) fue efectivamente mayor en la mucosa normal (37% en los NEC vs 17% en EC) y coincide con la incapacidad de lisis de las dianas epiteliales. Estas células tendrían un efecto supresor o una función reguladora, contrarrestando el efecto producido por el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  en la mucosa. En ratón, se ha descrito una población de IELs CD8 $\alpha\alpha$  que reconocen moléculas de clase 1b (TL) y protegen la mucosa por mecanismos dependientes de IL-10 (190).

Algunos IEL son productores de IL-2 (141,154). A nivel clonal, se encontró un mayor número de células capaces de producir IL-2 entre los IELs de muestras celíacas (44% vs 26% en clones NEC) y, entre ellos, más que sólo producían IL-2 e IFN- $\gamma$  (30% EC vs 4 % NEC) (Tabla 2.4). Otros autores no habían observado diferencias en la expresión de mRNA de IL-2 entre EC y controles (80). La IL-2 puede actuar sobre otros tipos celulares, induciendo un aumento de la actividad citotóxica, de la síntesis de otras citoquinas y/o de la expresión de Fas y Fas-L, incrementando la apoptosis de los enterocitos (228). La expresión de IL-2 en clones celíacos también sustenta la posibilidad de que su crecimiento sea independiente de otras células, favoreciendo una respuesta más eficiente, como la observada en linfocitos infiltrantes de tumores (229). Esta IL-2 podría también ser un cofactor en el aumento de expresión de NKG2D mediada por IL-15 (97) descrito recientemente en la enfermedad celíaca (195). La marcada tendencia a la expresión alternativa

de IL-2 o de IL-10 por los clones IEL (19/26 IL-10<sup>+</sup> no expresaban IL-2 y 15/21 IL-2<sup>+</sup> no expresaban IL-10), sugiere que la IL-10 podría estar, en una situación no patológica, inhibiendo la síntesis de IL-2 por estas células (230).

Otras citoquinas capaces de contrarrestar el efecto del IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  son la IL-4 y la IL-5. Según nuestro conocimiento este es el primer trabajo que demuestra la producción de IL-4 por IELs CD8<sup>+</sup> tras su activación *in vitro*. Anteriormente se había demostrado que podía ser producida por algunos LPL y por IELs CD4<sup>+</sup> (156). Dado que la proporción de IELs productores de IL-4 fue semejante en clones EC y NEC (20% vs 22%), su papel estaría asociado a la inmunoregulación en la mucosa normal y su expresión no estaría relacionada con la patología. Además de su función antiinflamatoria, la IL-4 puede actuar sobre la proliferación de los IELs (155). También puede alterar la permeabilidad de la membrana de las células epiteliales, reduciendo la liberación de iones Cl<sup>-</sup>, aumentando así el transporte de metabolitos a través de la mucosa (231). Considerando nuestros datos, los IELs CD8<sup>+</sup> podrían ser también los responsables de estas funciones.

Es la primera vez que se describe la expresión de IL-5 por IELs CD8<sup>+</sup>. La expresión de mRNA para IL-5 había sido demostrada en eosinófilos en biopsias celíacas (91), pero no en IELs. La IL-5 puede inducir la activación de eosinófilos *in vitro* (232). En nuestro estudio, la frecuencia de clones productores de IL-5 fué baja (12% EC y 7% NEC) pero el 50% (3 EC) de alta reactividad citotóxica anti-epitelio. Su función, otra de un posible reclutamiento de eosinófilos al sitio de inflamación, está por definir.

Algunos receptores de quimiocinas se asocian a subtipos funcionales de linfocitos T, al menos en periferia. La expresión de CCR5, CXCR3 y CCR1 se vincula a linfocitos Th1 productores de IFN- $\gamma$  y la de CCR3 a Th2 productores de IL-4. Sin embargo, la expresión de estos receptores es variable y condicionada por factores como citoquinas o el grado de activación de la célula.

Todos los clones expresaban CXCR3, mientras que CCR5 se expresó en el 47 % de los clones NEC y el 61% de los EC. La expresión de estos receptores de quimiocinas que se inducen o incrementan en sitios de inflamación, confirma en parte los datos encontrados por otros autores en IELs (151). Sin embargo estos autores mostraban expresión de CCR5 en la totalidad de los linfocitos, si bien sostenían que CCR5 puede modularse en cultivo. No sabemos si las diferencias observadas en nuestros clones respecto a la expresión de CCR5 es consecuencia de la presencia de factores moduladores en el cultivo, o si se debe a poblaciones diferentes. En linfocitos de sangre periférica la expresión de ambos receptores es constitutiva, con la diferencia que los TCR  $\delta 2$  expresan niveles más elevados de CCR5 que los TCR  $\alpha\beta$  y que los pocos TCR  $\delta 1$  (233).

Sólo el 10% de los IELs CD8<sup>+</sup> estudiados expresaron CXCR4. CXCR4, receptor de SDF-1 $\alpha$  (Stromal Derived Factor-1 $\alpha$ : CXCL21), se detecta principalmente en linfocitos T $\alpha\beta$  RA<sup>+</sup> de sangre periférica, así como en células dendríticas, macrófagos, neutrófilos y linfocitos B (234). El hecho de que los IELs sean linfocitos T de memoria explicaría la ausencia de este receptor. SDF-1 $\alpha$  se expresa constitutivamente en un amplio número de tejidos, incluyendo el tracto gastrointestinal (152), lo que indicaría que su función es la atracción de células involucradas en la vigilancia del tejido y no de células inflamatorias. Es una de las pocas moléculas capaces de inducir la adhesión estable de linfocitos T en condiciones de flujo. La unión al receptor induce un incremento del

Ca<sup>++</sup> intracelular y la polimerización de fibras de miosina del citoesqueleto que facilitan la adhesión de  $\alpha 4\beta 7$  a MadCAM (235). Como se discutirá más adelante, nuestros datos demuestran que CXCR4 se expresa fundamentalmente en los linfocitos T  $\gamma\delta$  (ver Capítulo 4). No podemos descartar que la ausencia de CXCR4 en muchos de los clones CD8<sup>+</sup> se deba a la activación con PHA-L, que al igual que el PMA, anti-CD3 o IFN- $\gamma$ , inducen una depleción transitoria del receptor en la membrana (152).

La heterogeneidad en la reactividad anti-epitelio de los IELs permitió definir 4 grupos comunes entre los clones EC y los NEC. Los clones celíacos de alta reactividad epitelial (grupo I), produjeron IL-2 y no IL-10, mientras que ninguno de los clones del grupo I de la biopsia no celíaca expresaba IL-2. Es decir, que la dicotomía IL-2/IL-10 asociada a la presencia o ausencia de enfermedad era más evidente entre los clones reactivos que entre los grupos de baja reactividad. Entre éstos, la IL-10 seguía siendo mayoritaria en los clones NEC, mientras que la producción de IL-2 era similar entre los clones EC y los NEC. Estas tendencias, por lo tanto, relacionaban el reconocimiento de las células epiteliales con el patrón de citocinas y revelaban que la reactividad frente al epitelio era cualitativamente diferente en las células procedentes de individuos enfermos. El posible defecto de regulación asociado a la enfermedad celíaca estaría pues restringido a la población de IELs reactiva a epitelio.

A falta de datos bioquímicos concluyentes, se podría especular que entre las células reactivas a epitelio hay diferentes poblaciones funcionales de IELs. El primer grupo correspondería, a células reguladoras productoras de IL-10, presumiblemente relacionadas con la vigilancia del epitelio. Las células productoras de IL-2 serían minoritarias en ausencia de enfermedad. En la enfermedad celíaca se expandirían y como resultado, la producción de IL-10 sería menor. Alternativamente, se podría tratar de una sola población productora de IL-10 pero también en menor grado de IL-2. El microambiente inflamatorio de la enfermedad celíaca, haría que respondieran al reconocimiento de sus ligandos con señales diferentes, favoreciéndose la producción de IL-2. Un receptor candidato a intervenir en este proceso sería NKG2D, constitutivamente expresado por las células CD8 y de expresión similar en los clones EC y NEC. Según datos recientes, el ligando de NKG2D, MIC, está expresado a altos niveles en el epitelio afectado por la enfermedad celíaca y la interacción MIC/NKG2D está directamente involucrada en la atrofia de las vellosidades (168). Teniendo en cuenta que MIC se expresa en las líneas epiteliales aquí estudiadas, las células CD8 mediadora de este efecto, reconocerían el epitelio celíaco produciendo IL-2 y dominando sobre las células productoras de IL-10 o bien inhibiendo la expresión de IL-10 por ellas mismas.

El grupo II sería una población similar específica de ligandos diferentes y que probablemente utilice receptores moduladores diferentes a NKG2D, ya que la expresión de MIC es muy baja o nula en CaCo2. El grupo III son células con capacidad citotóxica, que podrían proceder de una expansión de las células de tipo NK existentes en el epitelio o bien podrían ser producto de la expansión *in vitro*. Los clones no reactivos (grupo IV) podrían tanto corresponder a poblaciones antígeno específicas convencionales como a células que carezcan de mecanismos efectores, como puede ser la ausencia de perforina o de adaptadores responsables de la señalización de receptor activadores (213).

No podemos descartar la intervención de otros receptores activadores o inhibidores de tipo NK. Si bien no vimos correlación entre la expresión de CD94 y la actividad citotóxica, no podemos descartar que el heterodímero CD94/NKG2C, cuya expresión la sugiere la expresión baja de CD94 en los clones, esté participando en el reconocimiento de algunas células epiteliales HLA-E positivas.

En resumen, los datos muestran una clara heterogeneidad en la población de IELs TCR  $\alpha\beta$ , CD8<sup>+</sup>. Destacamos el elevado número de IELs productores de IL-10 en biopsias control y una disminución de esta población en biopsias celíacas. La reactividad frente a líneas epiteliales también muestran una variabilidad funcional sugiriendo la existencia de diversos mecanismos en el reconocimiento en el que posiblemente haya más de un receptor implicado en disparar la acción de estos IELs.

## *Capítulo III*

### *Expansión de una población CD8<sup>+</sup> V $\alpha$ 2.3 productora de IL-4*

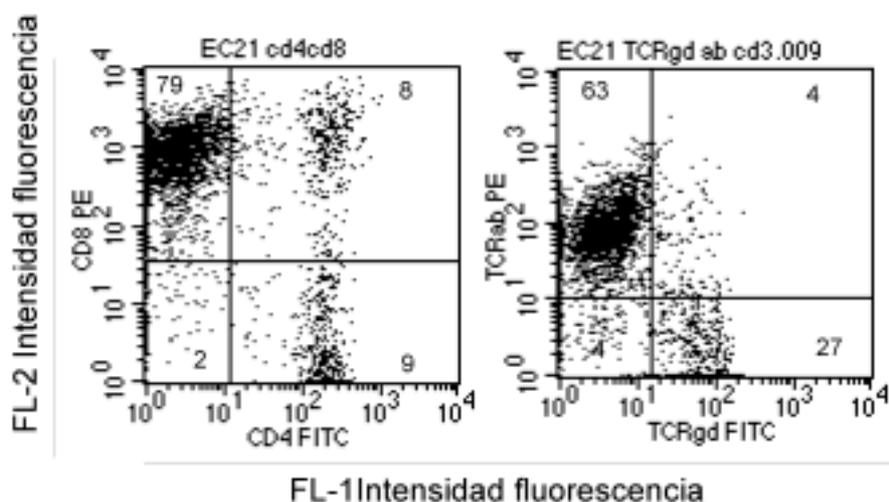
---



Análisis fenotípico y funcional de una población CD8<sup>+</sup> Va2.3 de lamina propia, expandida entre los linfocitos T de una biopsia celíaca.

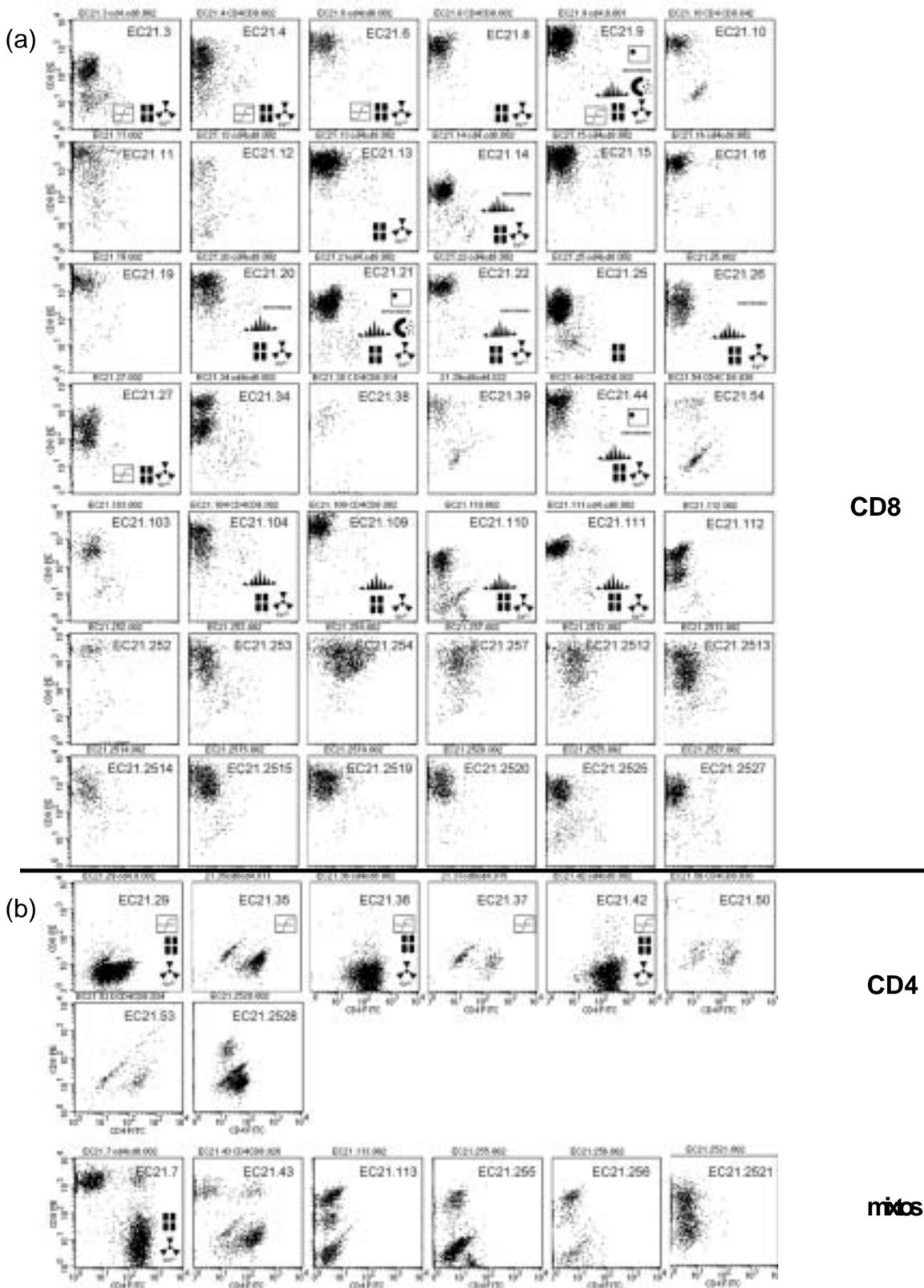
### 3.1 Fenotipo de los clones obtenidos de la expansión de células CD8<sup>+</sup> de una biopsia celíaca (EC21)

Una biopsia celíaca de grado IV, EC21, se disgregó mecánicamente y se cultivó en una placa de 24w durante 5 días. Las 80.000 células resultantes se estimularon siguiendo el protocolo estándar. Para permitir la expansión óptima de las poblaciones linfocitarias contenidas, se mantuvo el cultivo durante un total de 22 días, con una estimulación intermedia (día 12). Las células obtenidas ( $1.5 \times 10^6$ ) se congelaron hasta su clonación. El fenotipo de las poblaciones expandidas se muestra en la **figura 3.1**. Aproximadamente el 80 % de las células eran CD8<sup>+</sup> y el 9%, CD4<sup>+</sup>. El 63 % expresaba el TCR αβ y el 27 % el TCR γδ.



**Figura 3.1:** Fenotipo de las poblaciones de linfocitos T expandidas durante 22 días de cultivo de la biopsia celíaca EC21. La población CD8<sup>+</sup> representó el 79% de la población total. En el total de los linfocitos obtenidos, la mayoría (63%) expresaban el TCR αβ, si bien un alto porcentaje (27%) expresó el TCR γδ.

La población así expandida se clonó por dilución límite en presencia de Leucoaglutinina y rIL-2. Se sembraron placas con 25, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.6 y 0.3 células por pocillo, en que el crecimiento fue del 62%, 50%, 30%, 18%, 9%, 6% y 1%, respectivamente. Se obtuvieron un total de 71 líneas, 56 de las cuales se fenotiparon para los marcadores de superficie CD4 y CD8α (**figura 3.2**). El 75 % (42/56) de las líneas fueron CD8<sup>+</sup>, 14% (8/56) CD4<sup>+</sup> y 10 % (6/56) fueron poblaciones mixtas que contenían células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>/8<sup>+</sup>. Todas las líneas se analizaron para la expresión de TCR αβ y TCR γδ y tanto las CD4<sup>+</sup> como las CD8<sup>+</sup> fueron TCR αβ<sup>+</sup>, de manera que no se obtuvo ningún clon TCRγδ, a pesar de que en la población original existía un 27 % de estas células. Todos los linfocitos CD8<sup>+</sup> fueron negativos para la integrina CD103, es decir que no representaban una expansión de IELs sino de células CD8<sup>+</sup> derivadas de la lámina propia. Igual que el clon NEC44.25 descrito en el capítulo 1, estas líneas crecieron con una tasa alta de replicación. A lo largo del estudio se han obtenido más de 300 criotubos, de los cuales aproximadamente 100 corresponden a clones Vα2.3 productores de IL-4 (ver más adelante).



**Figura 3.2:** Fenotipo para los marcadores de superficie CD8 y CD4 de las líneas T obtenidas de la biopsia celvaca EC21. (a) Los recuadros representan las 42 líneas/clones CD8+ analizados. (b) Ocho clones CD4+ y 6 con un fenotipo mixto de células CD4+, CD8+ y dobles negativas. Las referencias insertadas indican los estudios que se han realizado en cada línea: Fenotipo; citotoxicidad; TCR- RT-PCR; secuenciación TCR; Sp ectratyping; Citoquinas CBA; Citoquinas por Real-Time PCR

### 3.2 Análisis del TCR

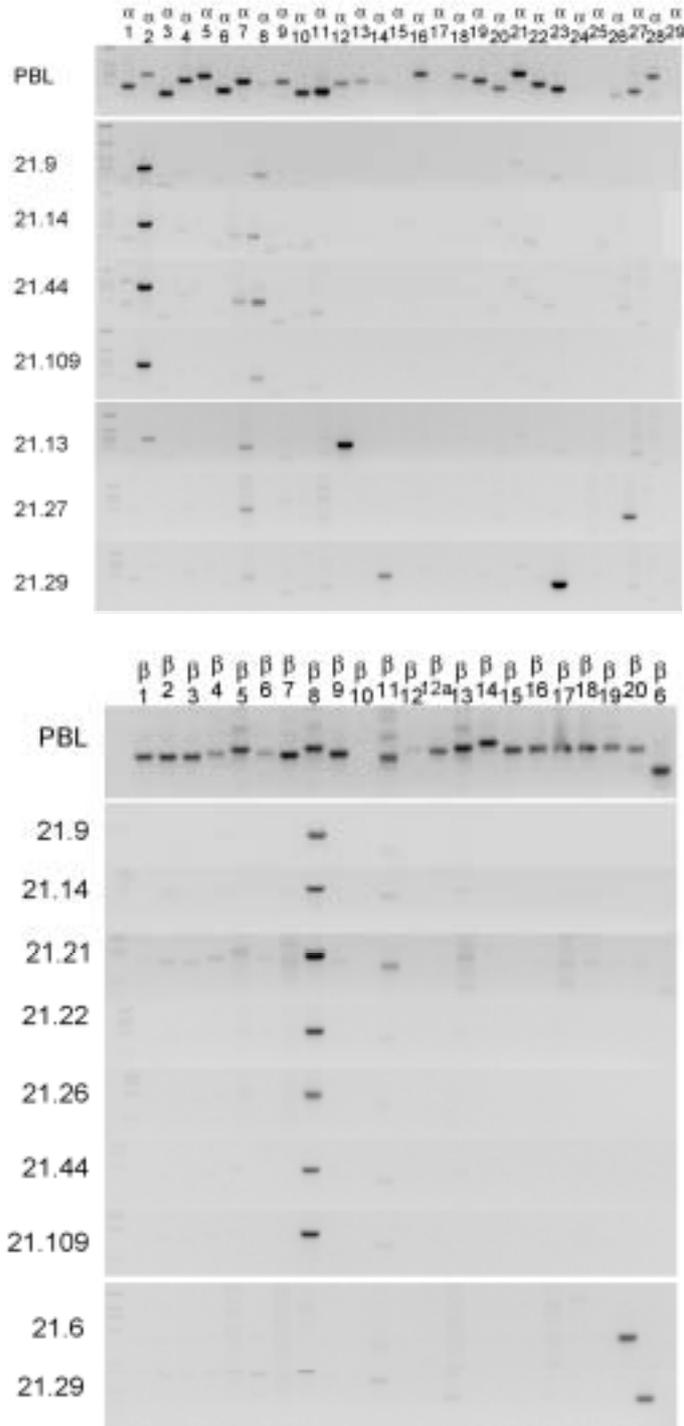
Para estudiar la clonalidad de las líneas obtenidas, se realizó el análisis de los genes variables del TCR. Se analizó el repertorio familias V $\alpha$  y V $\beta$  del TCR en 22 líneas, 19 CD8<sup>+</sup>, 3 CD4<sup>+</sup> y uno mixto (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>). Mediante la técnica de PCR y la utilización de oligosondas específicas se estudiaron 29 familias TRVA y 20 familias TRVB (ver Tabla III, Materiales y Métodos). Es importante notar que los cebadores específicos de cada región variable hacen referencia a la nomenclatura antigua. Son los más representativos, aunque no incluyen todos los segmentos posibles. En las Tablas III y IV (Materiales y Métodos) se muestra la correspondencia entre la nueva y la antigua nomenclatura. La nomenclatura actual de V $\alpha$ 2/V $\beta$ 8 corresponde a los genes TRVA12S1/TRVB12S3. A lo largo de la tesis, se mantendrá el uso de la nomenclatura anterior.

La figura 3.3 muestra el análisis de algunas de las líneas, utilizando como control positivo de amplificación de cada gen variable una muestra de PBL de un donante sano. Este tipo de análisis no es cuantitativo, ya que las condiciones de amplificación son las mismas (consenso) para todos los cebadores y no todos tienen igual temperatura óptima de unión. Así, la intensidad de las bandas obtenidas no necesariamente se correspondía con la expresión cuantitativa real de cada gen. Sin embargo, para el análisis de clones es un análisis válido, ya que sólo se determina presencia o ausencia de las bandas de amplificación.

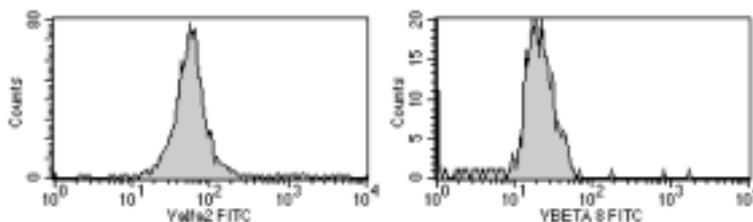
Los resultados mostraron que 11 de las 19 líneas CD8<sup>+</sup> analizadas utilizaban la familia TCRV $\alpha$ 2 (**tabla 3.1**). Diez de éstas también utilizaban el segmento correspondiente al gen TCRV $\beta$ 8. La expresión de estas cadenas variables en todos los casos, fue confirmada por tinción de membrana con anticuerpos específicos para V $\alpha$ 2 y V $\beta$ 8. Un ejemplo de estos resultados se muestra en la **figura 3.4**.

EC21	Fenotipo	TRV $\alpha$	TRV $\beta$
.3	CD8	18	6
.4	CD8	15	
.6	CD8	7	20
.7	CD8/4	10-11-12	2
.8	CD8	7-8-15	7
.9	CD8	2	8
.13	CD8	12	11
.14	CD8	2	8
.20	CD8	2-12	
.21	CD8	2	8
.22	CD8	2	8
.25	CD8	18	6
.26	CD8	2	8
.27	CD8	26	
.29	CD4	23	6
.36	CD4	6	5
.42	CD4	28	11-13
.44	CD8	2	8
.104	CD8	2	8
.109	CD8	2	8
.110	CD8	2	8-11-13
.111	CD8	2-18	8-11-13

**Tabla 3.1:** Uso de segmentos TCRV $\alpha$  y TCRV $\beta$  por las líneas aisladas de EC21. En blanco, no determinado.



**Figura 3.3:** a) Amplificación de los segmentos TRVA en algunas de las líneas analizadas. Imagen invertida de geles de agarosa teñidos con BrEt. Se visualizan las bandas de amplificación correspondientes al control positivo (PBL) y a distintos clones (4  $V\alpha 2$ , 1  $V\alpha 12$ , 1  $V\alpha 27$  y 1  $V\alpha 23$ ). En la mayoría de los casos, se observó la amplificación es de un único fragmento variable. Las bandas de menor intensidad observadas corresponden en la mayoría de los casos a restos de las células *feeders* utilizadas para la estimulación de los clones. b) Amplificación de los segmentos TRVB en algunos clones analizados, en las mismas condiciones que en a). Se muestran 7 clones  $V\beta 8$ , 1  $V\beta 20$  y 1  $V\beta 6$ .



**Figura 3.4:** Tinción de superficie con AcMo's específicos de las regiones variables V $\alpha$ 2 y V $\beta$ 8. Se muestra la tinción realizada sobre un clon representativo (EC21.44), que confirma los resultados obtenidos por RT-PCR. Este control se realizó en todos los clones V $\alpha$ 2/V $\beta$ 8.

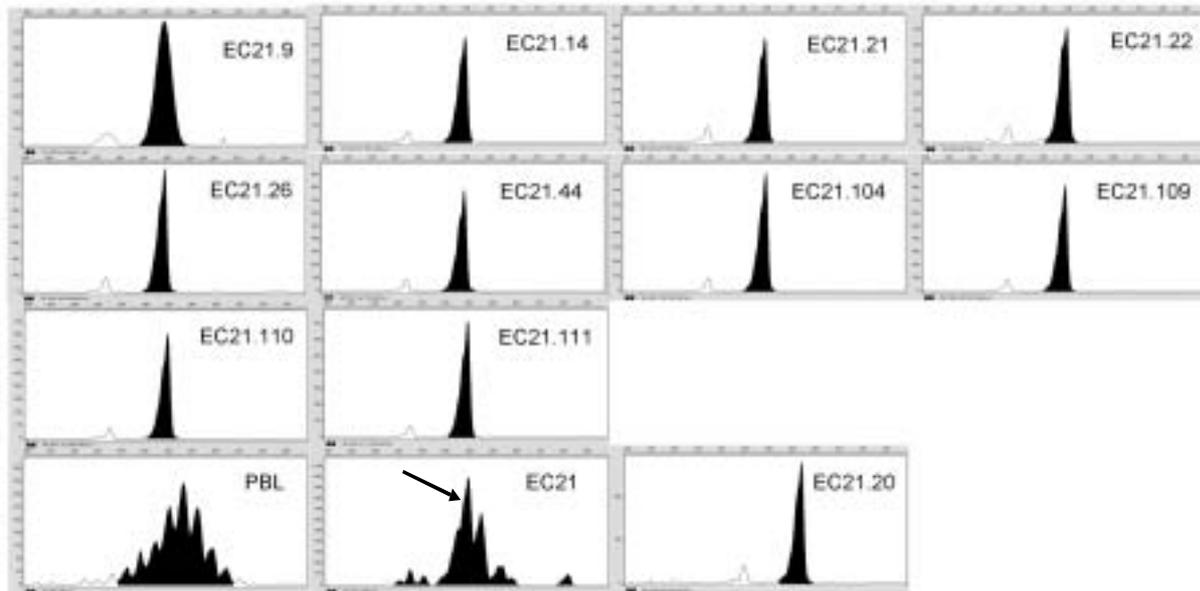
### 3.3 Determinación de la clonalidad del receptor

#### 3.3.1 Análisis de la longitud del CDR3 de los amplímeros de V $\alpha$ 2 y V $\beta$ 8

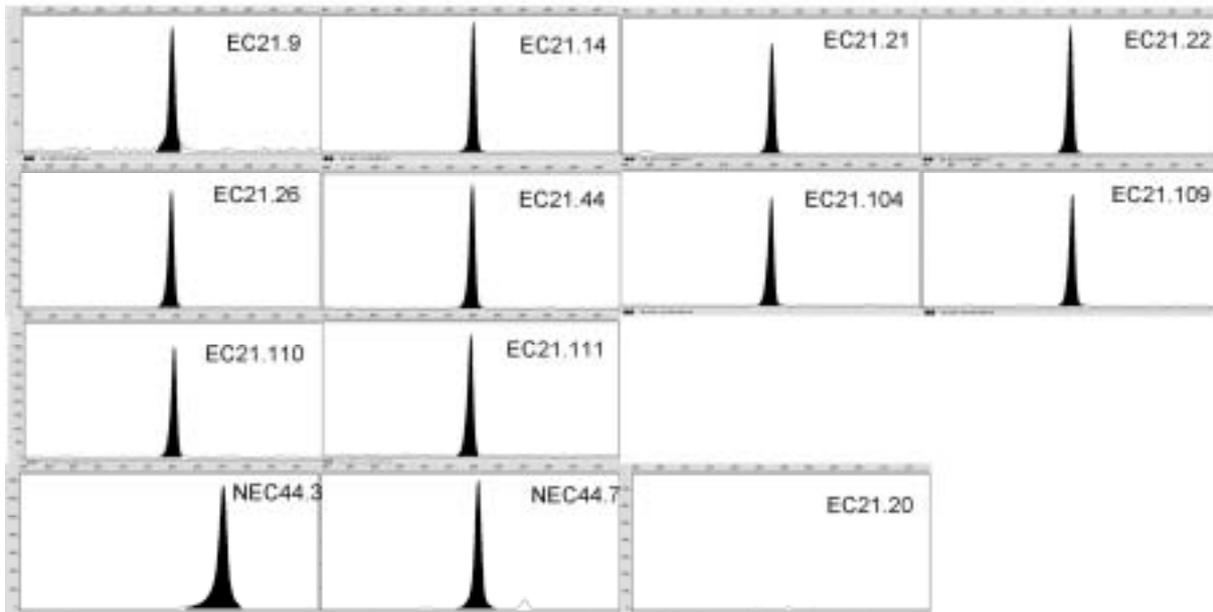
La expresión de un sólo segmento variable sugería pero no demostraba clonalidad, ya que no todas las células que utilizan un determinado segmento variable presentan el mismo reordenamiento. Por otra parte, la presencia de un número importante de líneas que utilizaban segmentos variables comunes (V $\alpha$ 2 y V $\beta$ 8) sugería, pero no demostraba, la presencia de una expansión clonal en la población.

Para demostrar la clonalidad de los receptores, se estudió la longitud del CDR3 de cada cadena del receptor, mediante electroforesis capilar de cada amplímero (*Spectratyping*). Según se puede observar en la **figura 3.5**, el fragmento CDR3 de los V $\alpha$  en 10 de los 11 clones V $\alpha$ 2 tenían el mismo tamaño. Se pudo observar que el pico presente en los diez clones era dominante ya que fué el de mayor intensidad dentro de los V $\alpha$ 2 del total de linfocitos aislados de la biopsia (EC21). A su vez, el CDR3 de los V $\beta$ 8 expresados por los mismos clones era también de idéntico tamaño. Todo ello sugería que estábamos ante una población clonal expandida en el cultivo de EC21.

a)



b)



**Figura 3.5:** Análisis de la longitud del CDR3 por spectratyping. (a) Todos los clones  $V\alpha 2$  menos EC21.20 (que no es  $V\beta 8$ ), presentaron la misma longitud del CDR3. La distribución por tamaños de los fragmentos  $V\alpha 2$  en PBL mostró una distribución normal. El amplímero de  $V\alpha 2$  en la biopsia EC21 mostró una distribución que sugería oligoclonalidad, con dominancia de un pico de idéntico tamaño al de los clones  $V\alpha 2^+$  (flecha). (b) El tamaño del CDR3 también se demostró idéntico para todos los clones  $V\beta 8$  aislados del cultivo de EC21 y diferente en dos clones  $CD4^+ V\beta 8$  aislados de otra biopsia (NEC44.3 y NEC44.7).

### 3.3.2 Secuenciación de la cadena $\alpha$ del TCR

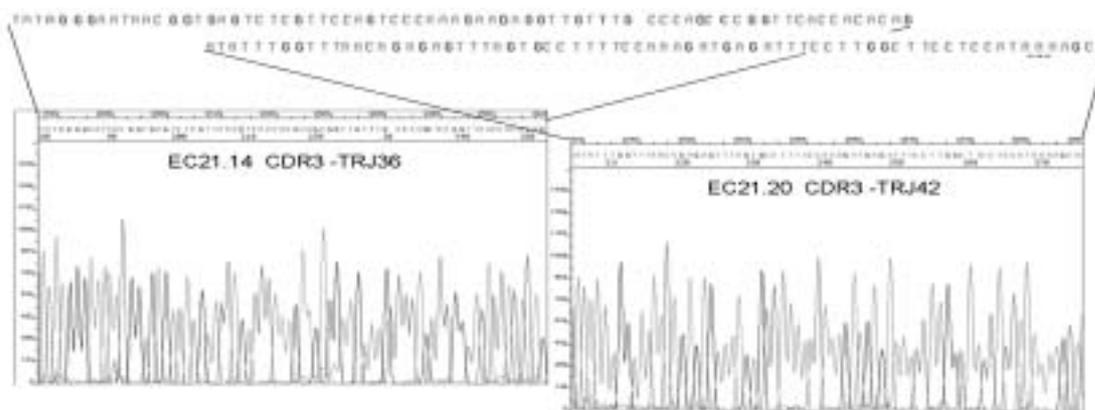
Para confirmar la clonalidad de las células V $\alpha$ 2 con igual longitud de CDR3, se secuenciaron los fragmentos variables del gen de la cadena  $\alpha$  del TCR de 5 clones, EC21.14, 20, 21, 22 y 26. De éstos, los cuatro que utilizaban el fragmento V $\beta$ 8 compartían la misma secuencia, que a su vez era diferente de la utilizada por el clon EC21.20, que no era V $\beta$ 8<sup>+</sup>. Las dos secuencias obtenidas se muestran en la **figura 3.6**. La secuencia común corresponde a uno de los tres genes descritos para el subgrupo V $\alpha$ 2 (TRAV2S3), que según la nomenclatura actual, corresponde al gen variable TRAV12S1 (AC: AE000659) (236). Dentro de la región CDR3, estos clones reordenaron el segmento TRAJ36, de los posibles 61 segmentos TRAJ presentes en el locus alfa del TCR (AC:M94081). Esta secuencia está presente entre las bases 45411 y 45351. Durante el reordenamiento de segmentos V-J, la TdT añadió un total de 4 nucleótidos no codificados en el genoma. En las figuras se muestran las secuencias obtenidas.

El clon EC21.20 utiliza otro segmento variable del subgrupo V $\alpha$ 2 (TRVA2S1), correspondiente al segmento TRAV12S2, según la nomenclatura actual.

### 3.3.3 Secuenciación de la cadena $\beta$ del TCR

Utilizando el mismo protocolo, se obtuvo la secuencia del gen TRBV presente en los clones V $\beta$ 8 (TRBV8S1 (AC: X07192) (237)) y ésta correspondió con TRBV12S3, según la nomenclatura actual, uno de los tres genes descritos para el subgrupo TRBV12. Según la secuencia del CDR3, estos clones utilizan los segmentos TRBJ2S7, de los posibles 12-13 segmentos J presentes en el locus beta del TCR (AC: M14159). En este reordenamiento del CDR3, se utilizaron 5 nucleótidos de uno de los dos segmentos de diversidad (TCRD2.1) más un total de 4 nucleótidos no codificados en el genoma (**figura 3.7**). Puede ser relevante comentar que otros autores han encontrado el mismo segmento J2S7 en biopsias celíacas (164) (ver discusión).

(a)



(b) Secuencia del fragmento CDR3 de la cadena  $V\alpha$  de los clones  $V\alpha 2/V\beta 8$ :

GTG GTG AAC CCG GCT GGG GCA AAC AAC CTC TTC TTT GGG ACT GGA ACG AGA CTC ACC GTT ATT CCC TAT ATC  
 V V N R A G A N N L F F G T G T R L T V I P Y I

(c) Secuencia del fragmento CDR3 del clon EC21.20 :

TGC TTT TAT GGA GGA AGC CAA GGA AAT CTC ATC TTT GGA AAA GGC ACT AAA CTC TCT GTT AAA CCA AAT ATC  
 C F N G G S Q G N L I F G K G T K L S V K P N I

(d) Secuencia completa de la cadena alfa de los clones  $V\alpha 2/V\beta 8$  (TCRVA2S3-TRJ36-TRCA):

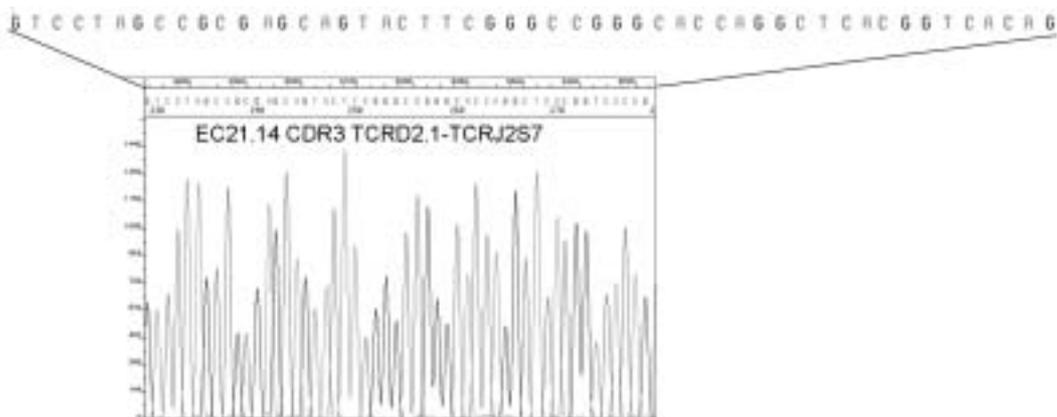
ATGATATCCT TGAGAGTTTT ACTGGTGATC CTGTGGCTTC AGTTAAGCGG GTTTGGAGC CAACGGAAGG  
 AGGTGGAGCA GGATCCTGGA CCCTTCAATG TTCCAGAGGG AGCCACTGTC GCTTTCAAC TGTACTTACA  
 GCAACAGTGC TTCTCAGTCT TTCTTCTGGT ACAGACAGGA TTGCAGGAAA GAACCTAAG TTGCTGATGT  
 CCGTATACTC CAGTGGTAAT GAAGATGGAA GGTTTACAGC ACAGCTCAAT AGAGCCAGC CAGTATATTT  
 CCCTGCTCAT CAGAGACTCC AAGCTCAGTG ATTCAGCCAC CTACCTCTGT GTGGTGAAC CCGGCTGGGG  
 CAAACAACCT CTTCTTTGGG ACTGGAACGA GACTCACCGT TATTCCCTAT ATCCAGAAC CCTGACCCTG  
 CCGTGTACCA GCTGAGAGAC TCTAAATCCA GTGACAAGTC TGTCTGCCTA TTCACCGAT TTTGATTCTC  
 AAACAAATGT GTCACAAAGT AAGGATCTCT ATGTGTATAT CACAGACAAA ACTGTGCTA GACATGAGGT  
 CTATGGACTT CAAGAGCAAC AGTGCTGTGG CCTGGAGCAA CAAATCTGAC TTTGCATGT GCAAACGCCT  
 TCAACAACAG CATTATTCCA GAAGACACCT TCTTCCCCAG CCCAGG

(e) Secuencia completa de la cadena alfa del clon EC21.20 (TCRVA2S1-TRJ42-TRCA):

ATGATGAAAT CCTTGAGAGT TTTACTAGTG ATCCTGTGGC TTCAGTTGAG CTGGGTTTGG AGCCAACAGA  
 AGGAGGTGGA GCAGAATTCT GGACCCCTCA GTGTTCCAGA GGGAGCCATT GCCTCTCTCA ACTGCACCTA  
 CAGTGACCGA GGTTCCCAGT CCTTCTCTCG GTACAGACAA TATTCTGGGA AAAGCCCTGA GTTGATAATG  
 TTCATATACT CCAATGGTGA CAAAGAAGAT GGAAGGTTTA CAGCACAGCT CAATAAAGCC AGCCAGTATG  
 TTTCTCTGCT CATCAGAGAC TCCCAGCCCA GTGATTACAG CACCTACCTC TGTGCCGTGC TTTTATGGAG  
 GAAGCCAAGG AAATCTCATC TTTGGAAAAG GCACTAAACT CTCTGTTAAA CCAAATATCC AGAACCCCTGA  
 CCCTGCCGTG TACCAGCTGA GAGACTCTAA ATCCAGTGAC AAGTCTGTCT GCCTATTAC CGATTTTGAT  
 TCTCAAACAA ATGTGTCACA AAGTAAGGAT TCTGATGTGT ATATCACAGA CAAAAGTGTG CTAGACATGA  
 GGTCTATGGA CTTCAAGAGC AACAGTGCTG TGGCCTGGAG CAACAAATCT GACTTTGCAT GTGCAAACCG  
 CTTCAACAAC AGCATTATTC CAGAAGACAC CTTCTTCC

**Figura 3.6:** Secuencia de los genes  $V\alpha 2$ . (a) Resultado de la cromatografía capilar del CDR3 de dos clones (EC21.14 y EC21.20). (b) Secuencia del fragmento CDR3 de los clones  $V\alpha 2/V\beta 8$ . (c) Secuencia del fragmento CDR3 del clon EC21.20 ( $V\alpha 2$ ). (d) y (e) Secuencia completa de la cadena alfa de los clones  $V\alpha 2/V\beta 8$  y del clon EC21.20, respectivamente. La secuencia subrayada corresponde a la de los cebadores utilizados para la amplificación.

(a)



(b) Secuencia del fragmento **CDR3** de la cadena V $\beta$  de los clones V $\alpha$ 2/V $\beta$ 8:

V D J C  
 AGC AGT CCT AGC CGC GAG CAG TAC TTC GGG CCG GGC ACC AGG CTC ACG GTC ACA GAG GAC CTG AAA  
 S S P S R E Q Y F G P G T R L T V T Q D L K

(c) Secuencia completa de la cadena beta de los clones V $\alpha$ 2/V $\beta$ 8 (TRVB8S1-TCRD2.1-TCRBJ2S7-TRCB):

ATGGACTCCT GGACCTTCTG CTGTGTGTCC CTTTGCATCC TGGTAGCGAA GCATACAGAT GCTGGAGTTA  
 TCCAGTCACC CCGCCATGAG GTGACAGAGA TGGGACAAGA AGTGACTCTG AGATGTAAAC CAATTTTCAGG  
 CCACAACCTCC CTTTTCTGGT ACAGACAGAC CATGATGCGG GGACTGGAGT TGCTCATTTA CTTTAACAAC  
 AACGTTCCGA TAGATGATTC AGGGATGCC GAGGATCGAT TCTCAGCTAA GATGCCTAAT GCATCATTCT  
 CCACTCTGAA GATCCAGCCC TCAGAACCCA GGGACTCAGC TGTGTAICTC TGTGCCAGCA GTCTTAGCCG  
 CGAGCAGTAC TTCGGGCCCG GCACCAGGCT CACGGTCACA GAGGACCTGA AAAACGTGTT CCCACCCGAG  
 GTCGCTGTGT TTGAGCCATC AGAAGCAGAG ATCTCCCACA CCCAAAAGGC CACACTGGGT TGCCTGGCCA  
 CAGGCTTCTA CCCCAGCCAC GTGGAGCTGA GCTGGTGGGT GAATGGGAAG GAGGTGCACA GTGGGGTCAG  
 CACAGACCCG CAGCCCCTCA AGGAGCAGCC CGCCCTCAAT GACTCCAGAT ACTGCCTGAG CAGCCGCTG  
 AGGGTCTCGG CCACCTTCTG GCAGAACCCC CGCAACCACT TCCGCTGTCA AGTCCAGTTC TACGGGCTCT  
 CGGAGAATGA CGAGTGGACC CAGGATAGGG CCAAACCTGT CACCCAGATC GTCAGCGCCG AGGCCTGGGG  
 TAGAGCAG

**Figura 3.7:** Secuencia del gen TRVB8 expresado por los clones (a) Resultado de la secuenciación por cromatografía capilar del CDR3 del clon EC21.14. (b) CDR3 del clon EC21.14. D: segmento de diversidad, J: segmento de unión. (c) Secuencia completa de la cadena beta. La secuencia subrayada corresponde a la de los cebadores utilizados para la amplificación

Secuencias obtenidas de: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) base de datos : Nucleotide

1) «TCRAV12S1» = old TCRAV2S3

LOCUS: HUAE000659 (251199 bp DNA linearPRI 15-JUN-2001)

DEFINITION: Homo sapiens T-cell receptor alpha delta locus from bases 250472 to 501670 (section 2 of 5) of the Complete Nucleotide Sequence.(236)

ACCESSION AE000659 AE000521 U85199

Secuencia proteica:

MISLRVLLVILWLQLSWVWSQRKEVEQDPGPFNVPEGATVAFNCTYSNSASQSFFW  
YRQDCRKEPKLLMSVYSSGNEDGRFTAQLNRSQYISLLIRDSKLSDSATYLCVNV

AAGAATGATG ATATCCTTGA GAGTTTTACT GGTGATCCTG TGGCTTCAGT TAAGCTGTGA GTTGGGCATC  
TCTATAGGAA CATAATGTAC AATATTTTGA GATATTGTCT ATCCTAGGCT GGGGGCTAGA AGCCTGAATT  
TTTTCTCTAA CTAAGAGAGT AGAAAGCCTG TAAAAACATG ATTTGAATTC TGGGGAGTAA GCATTTACCT  
CCCAATTTGT CTCTCTGTG TGACCACTGT CTTTTTCACA GGGGTTTGA GCCAACGGAA GGAGGTGGAG  
CAGGATCCTG GACCTTCAA TGTTCCAGAG GGAGCCACTG TCGCTTCAA CTGTACTTAC AGCAACAGTG  
CTTCTCAGTC TTTCTCTGG TACAGACAGG ATTGCAGGAA AGAACCTAAG TTGCTGATGT CCGTATACTC  
CAGTGGTAAT GAAGATGGAA GGTTTACAGC ACAGCTCAAT AGAGCCAGCC AGTATATTTT CCTGCTCATC  
AGAGACTCCA AGCTCAGTGA TTCAGCCACC TACCTCTGTG TGGTGAACAC ACAGTGCTCC

2) «TCRAV12S2» = old TCRAV2S2

LOCUS: HUAE000659 (251199 bp DNA linearPRI 15-JUN-2001)

DEFINITION: Homo sapiens T-cell receptor alpha delta locus from bases 250472 to 501670 (section 2 of 5) of the Complete Nucleotide Sequence.(236)

ACCESSION AE000659 AE000521 U85199

Secuencia proteica:

MMKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYR  
QYSGKPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSATYLCVNV

TTGAATCCTC AGTGAACCAG GGCAGAGAAG AATGATGAAA TCCTTGAGAG TTTTACTAGT GATCCTGTGG  
CTTCAGTTGA GCTGTGAGTT TGGGGCATCT TTATATAGGA AAATAATGTA CAGTATCTGG AGTFACTGTCT  
TATTTCTAGAT CTATAGGTAG AAGCATGATT TTTTTTCTAA CTAAGGGAAA GTAGGGGCAC CAGTGAAAAG  
AGGATTTAAA TTCTGGGGAG TAAGCATCTA TTACCAGCC AGTCTTCTCT GTCTGACCAC TGTCTTTTTT  
ACAGGGGTTT GGAGCCAACA GAAGGAGGTG GAGCAGAATT CTGGACCCT CAGTGTTCGA GAGGGAGCCA  
TTGCCTCTCT CAACTGCAC TACAGTGACC GAGGTTCCCA GTCCTTCTTC TGGTACAGAC AATATTTCTGG  
GAAAAGCCCT GAGTTGATAA TGTTCAATA CTCCAATGGT GACAAAGAAG ATGGAAGGTT TACAGCACAG  
CTCAATAAAG CCAGCCAGTA TGTTTCTCTG CTCATCAGAG ACTCCAGCC CAGTGATTCA GCCACCTACC  
TCTGTGCCGT GAACACACAG TGCTCCCAG ACACCTGCAG TCTGTACCCA AACCTGCCAT GCCCAGGAA  
TGCCTGATGT AGAGCTTAGA CTGCAGGGTA GTGAAACTCC CCTTGCTCTC TAGTTTCAAG TGGAAATTAT  
AAGAACCAGT ATGGAGGATT

3) «TCRAJ36» y «TCRAJ42»

LOCUS: HUMTCRADCV (97630 bp DNA linear PRI 25-OCT-2001)

DEFINITION Human Tcr-C-delta gene, exons 1-4; Tcr-V-delta gene, exons 1-2; T-cell receptor alpha (Tcr-alpha) gene, J1-J61 segments; and Tcr-C-alpha gene, exons 1-4.(236)

ACCESSION:M94081

«TCRAJ36»

AGAAAATTTG GCTTAGTAGG AAAGTGTTTT TGTACTGGGC AGAAACACTG TGTCAAACCTG GGGCAAAACA  
CCTCTTCTTT GGGACTGGAA CGAGACTCAC CGTTATTCCC TGTAAGTCCT TACCTCTTGA CAAAAAGCT  
CTTAGTCTGT AATGACAAGT TCTCACATCC CAGACACCTA

«TCRAJ42»

CCTCCATCCT TCCCACCTGT TGATTATTGT AAAGCCCAT AGGACTGTGT GAATTATGGA GGAAGCCAAG  
GAAATCTCAT CTTTGAAAA GGCACATAAC TCTCTGTTAA ACCAAGTAAG TGTTGGGGAT TCAAAGTCCT  
GATTTATCAT CAGTACTTTG TCACTCTGGG CAACAGAATG

4): "TCRAC exón1"

AATGAGATCA TGTCCTAAC CTGATCCTCT TGTCCACAG ATATCCAGAA CCCTGACCCT GCCGTGTACC  
AGCTGAGAGA CTCTAAATCC AGTGACAAGT CTGTCTGCCT ATTCACCGAT TTTGATTCTC AAACAAATGT  
GTCAAAAAGT AAGGATTCTG ATGTGTATAT CACAGACAAA ACTGTGCTAG ACATGAGGTC TATGGACTTC  
AAGAGCAACA GTGCTGTGGC CTGGAGCAAC AAATCTGACT TTGCATGTGC AAACGCCTTC AACACAGCA  
TTATTTCCAGA AGACACCTTC TTCCCAGCC CAGGTAAGGG CAGCTTTGGT GCCTTCGCAG GCTGTTTTCT

Secuencias obtenidas de: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) base de datos : Nucleotide

1) *TCRVB12S3 = old TCRVB8S1*

LOCUS *HSTCBV81 (775 bp DNA linear PRI 16-JAN-1995)*

DEFINITION: *Human T-cell receptor V-beta 8.1 gene. (237)*

ACCESSION: *X07192 Y00349*

Secuencia proteica:

**MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHNSLFWYRQTM  
MRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKIQPSEPRDSA VYFCASSLA**

ACCGTGAATT GATAATATCA AAACAAATAT CCAGGGAGCC TCTGCAAGTG TGCATCTCTA TTTCACACCA  
ATTATAGTTG AGTTAATTCC TGCCTGATTC ATCTCCCAGA GATGCAGCCT CCTCTTAAAG AAGTTGGGGG  
TGGTGGCCCA TTCAGTGATG TCACTGACAG ATGCATTCTG TGGGGATAAA ATGTCACAAA ATTCATTCTT  
TTGCTCATGC TCACAGAGGG CCTGGTCTAG AATATTCCAC ATCTGCTCTC ACTCTGCCAT GGACTCCTGG  
ACCTTCTGCT GTGTGTCCCT TTGCATCCTG GTAGCGAGTG AGTCTTCAGA ATATTTGCCA TCATCAGGCT  
GGGCTTCTGC ATGGATGATC TCATATATTT TCCTTATCT GACGCCAAT TCTGTCTTCT TTCATAGAGC  
ATACAGATGC TGGAGTTATC CAGTCACCCC GCCATGAGGT GACAGAGATG GGACAAGAAG TGA CTCTGAG  
ATGTAAACCA ATTTTCAGGCC ACAACTCCCT TTTCTGGTAC AGACAGACCA TGATGCGGGG ACTGGAGTTG  
CTCATTTACT TTAACAACAA CGTTCGGATA GATGATTCAG GGATGCCCGA GGATCGATTC TCAGCTAAGA  
TGCCTAATGC ATCATCTCC ACTCTGAAGA TCCAGCCCTC AGAACCCAGG GACTCAGCTG TGTACTTCTG  
TGCCAGCAGT TTAGCCACAG CGCTGCAGAA TCACCCCTT CCTGTGCAGA AAACCCGGTG TTTCCCTTC  
TCCTT

2) *TCRBD2.1 y TCRBJ2S7*

LOCUS: *HUMTCBJD (3854 bp DNA linear PRI 13-JAN-1995)*

DEFINITION *Human T-cell receptor germline beta-chain D2.1 and J2.1 to J2.7genes.(238)*

ACCESSION: *M14159*

Segmento *TCRD2.1 «T-cell receptor beta-chain D2.1»*

CATTTTTGTA TCATGGTGTA ACATTGTGGG GACTAGCGGG AGGGCACGAT GATTCAGGTA

Segmento *TCRBJ2S7*

CCTTAGAGGT TTGCATGCGG GGGTGCACCT CCGTGCTCCT ACGAGCAGTA CTTCGGGCCG  
GGCACCAGG TCACGGTCAC AGGTGAGATT CGGGCGTCTC CCCACCTTC AGCCCTCGG

3) *TCRBC2*

LOCUS *HUMTCBCE 2008 bp DNA linear PRI 13-JAN-1995*

DEFINITION: *Human T-cell receptor germline beta-chain gene C-region C-beta-2.(2390)*

ACCESSION: *M12888*

Secuencia proteica

**DLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQP  
LKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVS  
AEAWGRADCGFTSES YQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMV KRKDSRG**

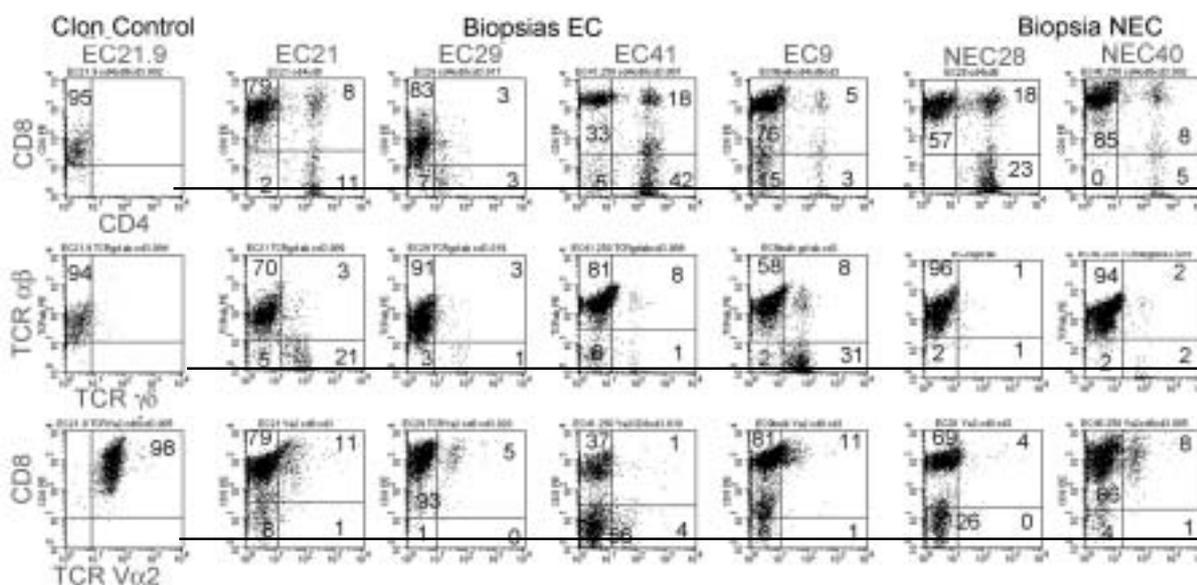
ATGGCGTAGT CCCCAAAGAA CGAGGACCTA GTAACATAAT TGTGCTTCAT TATGGTCTCT TCCC GGCCCTT  
CTCTCTCACA CATAACAGA GCCCCTACCA GGACCAGACA GCTCTCAGAG CAACCCTAGC CCCATTACCT  
CTTCCCTTTC CAGAGGACCT GAAAAACGTG TTCCACCCG AGGTCGCTGT GTTTGAGCCA TCAGAAGCAG  
AGATCTCCA CACCCAAAAG GCCACACTGG TGTGCCTGGC CACAGGCTTC TACCCCGACC ACGTGGAGCT  
GAGCTGGTGG GTGAATGGGA AGGAGGTGCA CAGTGGGGTC AGCACAGACC CGCAGCCCT CAAGGAGCAG  
CCCGCCCTCA ATGACTCCAG ATACTGCCTG AGCAGCCGCC TGAGGGTCTC GGCCACCTTC TGGCAGAACC  
CCCGCAACCA CTTCCGCTGT CAAGTCCAGT TCTACGGGCT CTCGGAGAAT GACGAGTGA CCCAGGATAG  
GGCCAAACCT GTCACCCAGA TCGTCAGCGC CGAGGCCTGG GGTAGAGCAG GTGAGTGGG CCTGGGGAGA  
TGCCTGGAGG AGATTAGGTG AGACCAGCTA CCAGGGAAAA

### 3.4 Expresión de $V\alpha 2$ en otras biopsias

El alto número de clones  $CD8^+ V\alpha 2$  obtenidos de la biopsia EC21 nos llevó a investigar la expresión de  $V\alpha 2$  en células  $CD8^+$  en cultivos no expandidos procedentes de ésta y otras biopsias.

Se analizaron las 4 biopsias EC (EC21, EC29, EC41 y EC9) y dos NEC (NEC28 y NEC40). El 11 % de los linfocitos  $CD8^+$  aislados de la biopsia EC21 fueron  $V\alpha 2^+$  (**figura 3.8**). En las otras tres biopsias celíacas analizadas, este porcentaje variaba entre un 1 y un 11 %. Es importante recordar que en PBL el porcentaje de células  $V\alpha 2 CD8^+$  varía entre 3 y 4.5 %. En las dos biopsias NEC analizadas (EC28 y EC40) el porcentaje fué del 4 y 8% respectivamente. Es decir, que no aparecía una expansión específica de células  $CD8 V\alpha 2$  en las biopsias celíacas que fuera diferente a la obtenida en las no patológicas.

Por otra parte, la diferencia entre los porcentajes de células  $CD8^+ V\alpha 2^+$  obtenidos tras el clonaje (50%) y el global de linfocitos de este fenotipo en la biopsia (11%), indica que la expansión in vitro favoreció a esta población, posiblemente debido a su capacidad de producir IL-2, a diferencia de otros clones  $CD8^+$  (ver más adelante).

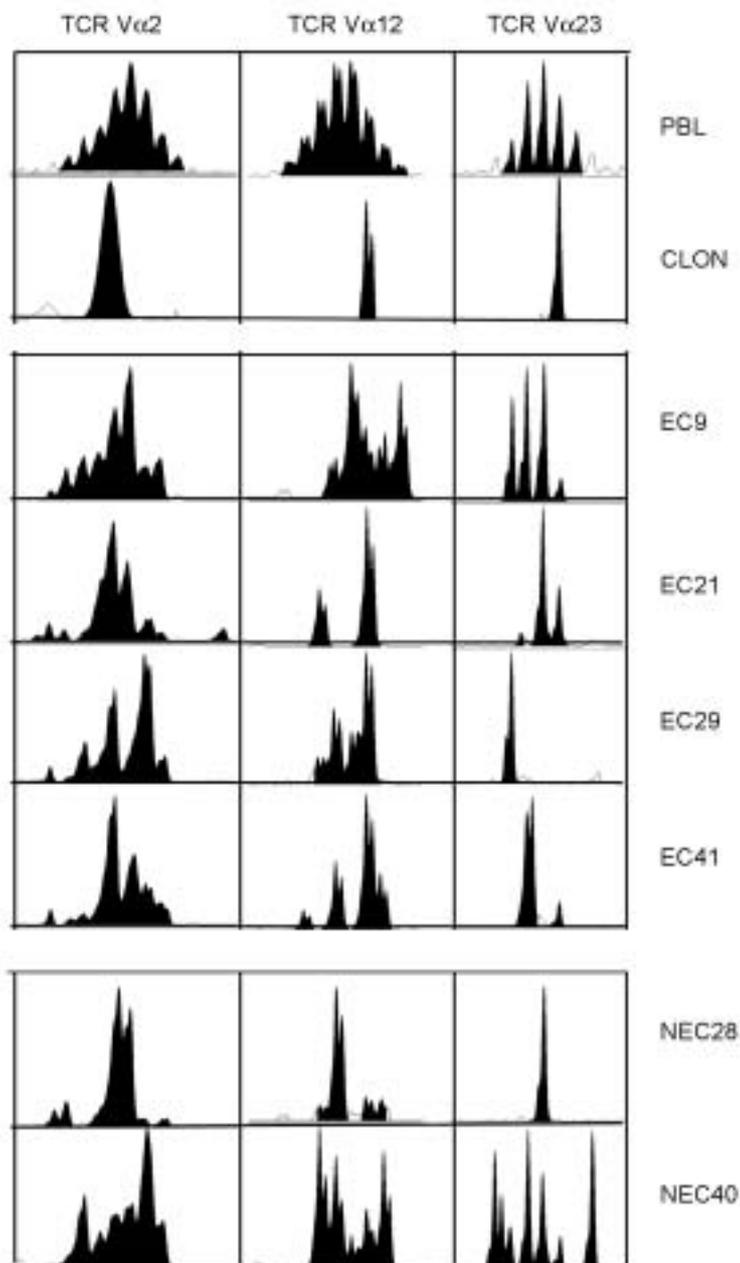


**Figura 3.8:** Análisis de la expresión de  $V\alpha 2$  en células  $CD8^+$  de las diferentes biopsias.

#### 3.4.1 Clonalidad del $V\alpha 2$ expresado en otras biopsias

El análisis de la longitud de los fragmentos CDR3 asociados con los genes variables  $V\alpha 2$ , nos permitió estudiar el nivel de clonalidad en los cultivos obtenidos de las diferentes biopsias. En las seis biopsias estudiadas, tanto EC como NEC, la distribución de longitudes de los fragmentos CDR3 asociados a  $V\alpha 2$  mostraba un patrón de oligoclonalidad, es decir, una distribución claramente distinta a la distribución normal correspondiente a policlonalidad que se observa en PBL y también diferente a los picos únicos de los clones de células T (**figura 3.9**). En todos los casos se observaron picos dominantes pero en cada una de las muestras estudiadas, estos picos correspondían a longitudes del CDR3 diferentes, por lo tanto a secuencias diferentes.

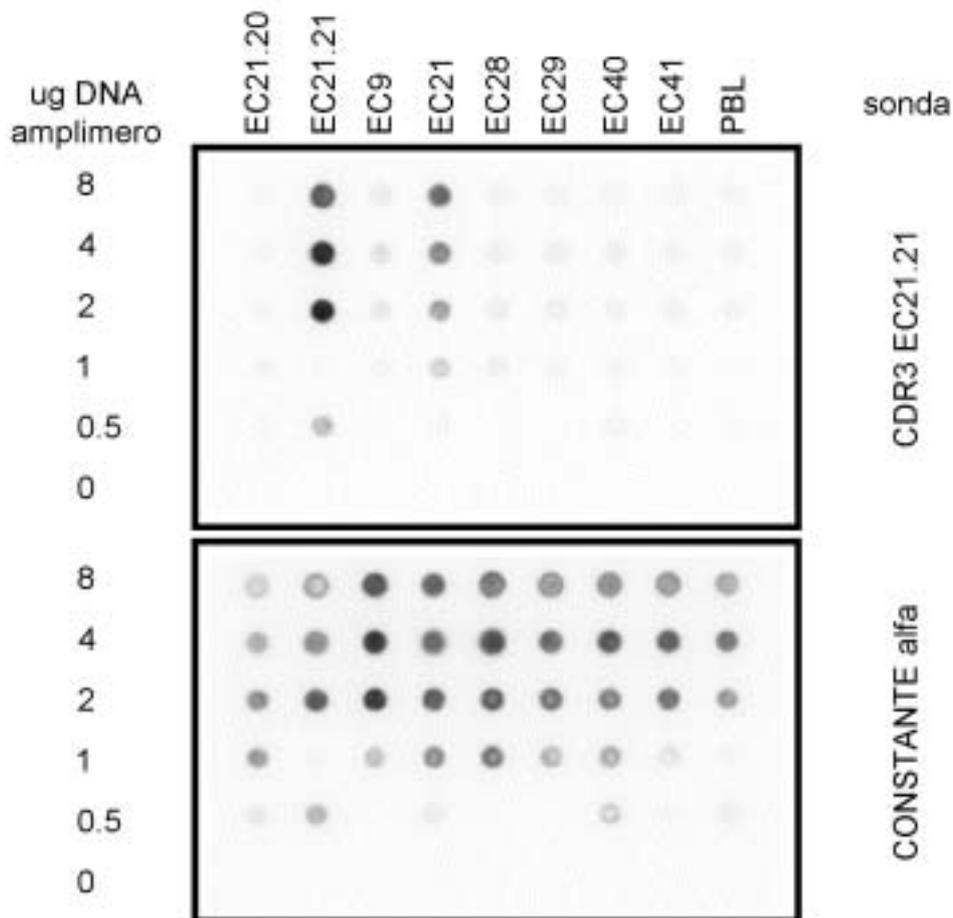
Patrones similares de oligoclonalidad se repitieron en amplímeros de otros segmentos variables, por ejemplo V $\alpha$ 12 (nueva nomenclatura, TRVA19) y V $\alpha$ 23 (TCRVA21) (**figura 3.9**). En todos los casos la distribución fue oligoclonal y en algunos casos casi monoclonal (por ejemplo V $\alpha$ 23 para EC29 y para NEC28). Mediante esta técnica de análisis de tamaño de CDR3, confirmamos de manera distinta a la demostrada en otros trabajos, que la población de linfocitos TCR $\alpha\beta$  presentes en la mucosa intestinal es oligoclonal, pero no se demuestra la dominancia de ninguna secuencia común específica de pacientes ni de controles.



**Figura 3.9:** Distribución de la longitud del CDR3 por spectratyping. Análisis de longitud del CDR3 para los amplímeros de V $\alpha$ 2 (TCRVA12), V $\alpha$ 12 (TRVA19) y V $\alpha$ 23 (TRVA21) de varias muestras diferentes (columna de la derecha). El spectratyping se realizó para cada segmento en una muestra de PBL y en el cultivo total de 4 biopsias celíacas (EC9, EC21, EC29 y EC41) y 2 no celíacas (NEC28 y NEC40). La distribución de tamaños muestra un reordenamiento policlonal del receptor en PBL y oligoclonal en las biopsias. Como control de monoclonalidad (tamaño único) se utilizaron tres clones (EC21.9, V $\alpha$ 2; EC21.13, V $\alpha$ 12 y EC21.29, V $\alpha$ 23)

3.4.2 Está presente el CDR3 dominante en EC21 en los clones V $\alpha$ 2 en otras biopsias?

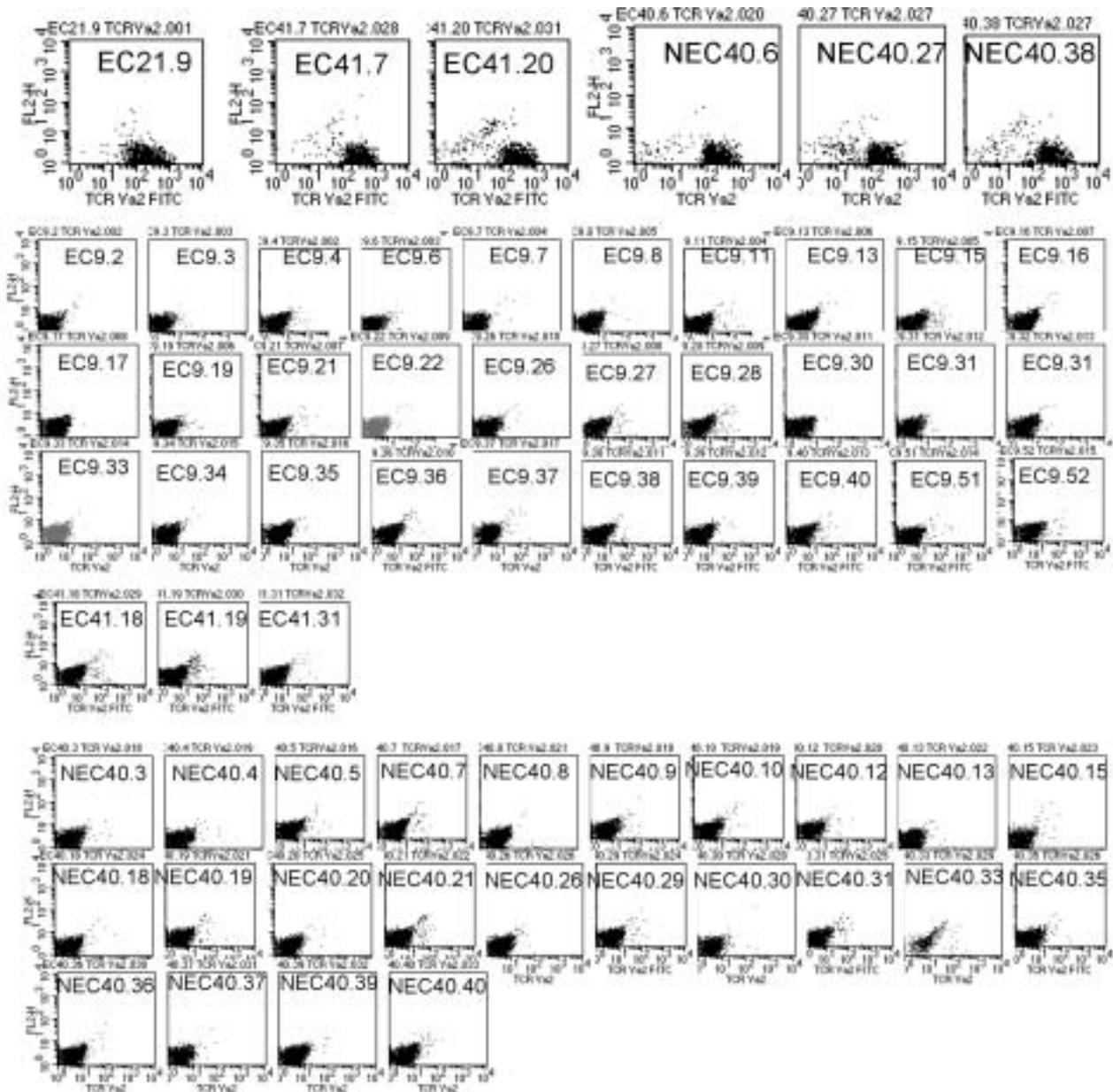
Como todas las biopsias estudiadas presentaron poblaciones relativamente abundantes de células V $\alpha$ 2, nos preguntamos si el CDR3 expandido en la biopsia EC21 estaría presente en otras biopsias. Para determinar si este fragmento estaba presente entre las células V $\alpha$ 2 de las diferentes muestras, los amplímeros, V $\alpha$ 2 de los cultivos de las seis biopsias antes analizadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante dot-blots, y se hibridaron con una sonda correspondiente a la secuencia obtenida del CDR3. Como control positivo, se utilizó el amplímero V $\alpha$ 2 del clon EC21.21 y como negativo el amplímero del clon V $\alpha$ 2 EC21.20, cuya secuencia CDR3 es diferente. Una sonda correspondiente a la cadena constante alfa (TRCA) se utilizó como control de hibridación. Los resultados de la hibridización, presentados en la **figura 3.10**, mostraron la presencia del fragmento sólo en la biopsia EC21. En el resto de las biopsias y en la muestra de PBL, no se detectó el mismo CDR3.



**Figura 3.10:** Hibridización con una sonda CDR3 específica. Los amplímeros de V $\alpha$ 2 fueron transferidos por duplicado (a y b) a una membrana de nitrocelulosa mediante *dot blot*. (a) La membrana se hibridó con una sonda correspondiente a la secuencia del CDR3 del clon EC21.21. Se observó positividad con el amplímero proveniente del cultivo de linfocitos de la biopsia EC21 y del control positivo, clon EC21.21. (b) Como control de transferencia del DNA al filtro de nitrocelulosa, se utilizó una sonda específica de la región TRCA (sonda constante alfa), que dió positiva con todas las muestras, analizadas a diferentes concentraciones.

### 3.4.3 Expresión de Vα2 en clones aislados de otras biopsias

Como se mostró más arriba, en el cultivo total de la biopsia EC9 había un porcentaje (11%) de células CD8<sup>+</sup> TCR Vα2, semejante a la biopsia EC21 (**figura 3.8**). 30 clones CD8 aislados de esta biopsia se analizaron por citometría de flujo tras inmunomarcación directa con AcMo anti-Vα2. Ninguno de los clones resultó ser positivo para este receptor. Sin embargo, de 5 clones CD8<sup>+</sup> aislados de la biopsia EC41, que tenía un porcentaje total de linfocitos CD8<sup>+</sup> Vα2<sup>+</sup> de sólo un 1%, dos (EC41.7 y EC41.20) resultaron positivos. Por otra parte, el análisis de 27 clones CD8<sup>+</sup> aislados de una biopsia no celíaca (NEC40, 8% CD8<sup>+</sup> Vα2<sup>+</sup>), nos dio 3 (12%) de clones Vα2 (NEC40.8, NEC40.27 y NEC40.38) (**figura 3.11**). No tenemos datos de los clones obtenidos de las biopsias restantes.



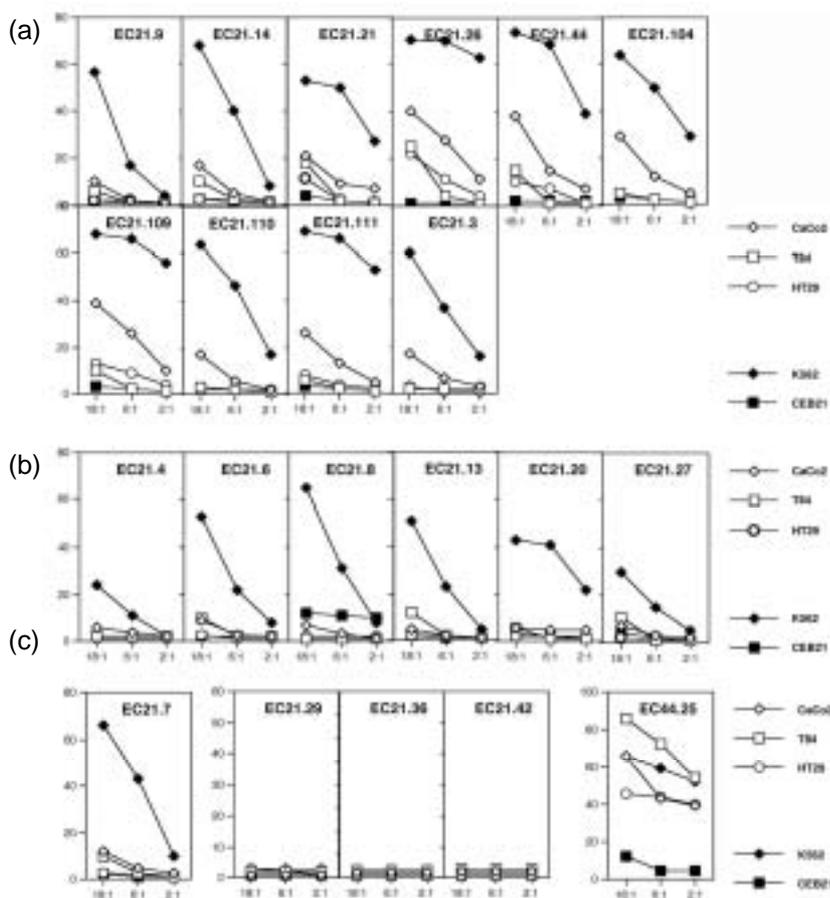
**Figura 3.11:** Expresión de Vα2 en clones CD8<sup>+</sup>. En la fila superior se muestran los clones Vα2 positivos de las biopsias EC41 (2) y NEC40 (3) comparados con uno de los clones positivos de EC21 (EC21.9). Las filas inferiores muestran la ausencia de expresión de Vα2 en los demás clones analizados.

### 3.5. Reactividad frente a células epiteliales

#### 3.5.1 Reconocimiento de las células Caco2

Para definir el fenotipo funcional de los clones obtenidos de la biopsia EC21, se determinó su actividad citotóxica frente a células epiteliales, en comparación con las IEL CD8<sup>+</sup> de otras muestras. Se estudiaron 18 clones CD8<sup>+</sup> (incluidos 9 V $\alpha$ 2V $\beta$ 8<sup>+</sup>), 3 clones CD4<sup>+</sup> y una línea de fenotipo mixto (EC21.7). Como control de reactividad epitelial se usó el clon IEL NEC44.25 (ver capítulo I). Como dianas control se probaron B-LCL autólogas (CEB21) y la diana de células NK K562.

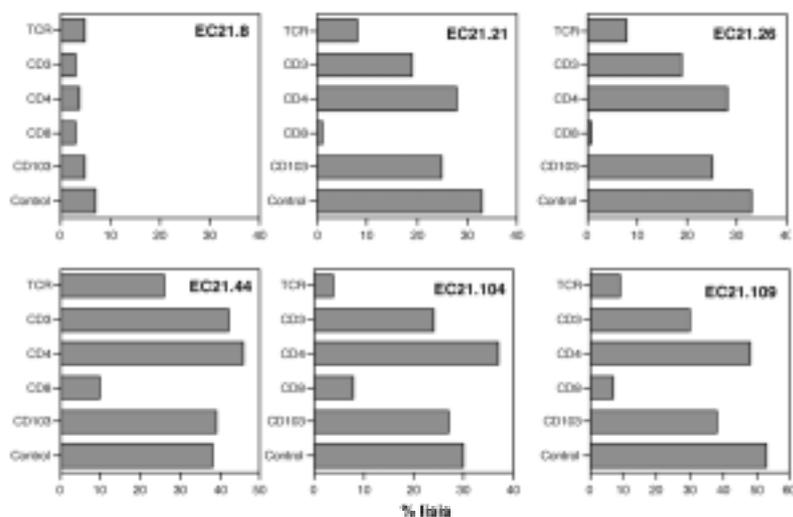
En todos los clones V $\alpha$ 2 y otros dos de distinto TCR (EC21.3 y 21.103) se observó reactividad media (por debajo del 40%) contra la línea Caco2, a una relación efectora:diana de 18:1 (**figura 3.12**). Estos clones no mostraron reactividad detectable contra las otras líneas de células epiteliales, ni contra la B-LCL autóloga, pero todos tenían actividad de tipo NK. Es interesante señalar que esta reactividad era casi exclusiva de las células V $\alpha$ 2V $\beta$ 8. Sólo uno de los clones con este patrón de citotoxicidad no expresaba ese TCR (EC21.3). El resto de clones CD8<sup>+</sup> mostraron un patrón de lisis diferente, en el cual la única diana lisada a niveles medios fué la K562, es decir eran clones con actividad de tipo NK pero no reconocían dianas epiteliales. Los tres clones CD4<sup>+</sup> no lisaban ninguna de las dianas celulares utilizadas.



**Figura 3.12:** La reactividad epitelial de los clones V $\alpha$ 2V $\beta$ 8 está restringida a la línea Caco2. (a) Clones CD8<sup>+</sup> que lisan únicamente la línea Caco2. Nueve de los 10 clones son V $\alpha$ 2. (b) Clones CD8<sup>+</sup> con actividad de tipo NK pero sin reactividad epitelial. (c) La línea de fenotipo mixto EC21.7 mostró un patrón de tipo NK, presumiblemente asociable a la población CD8<sup>+</sup>. Como control negativo, tres clones CD4<sup>+</sup> sin capacidad citotóxica. Como control positivo capaz de lisar todas las dianas epiteliales, el clon NEC44.25.

### 3.5.2 El TCR está involucrado en el reconocimiento de Caco2

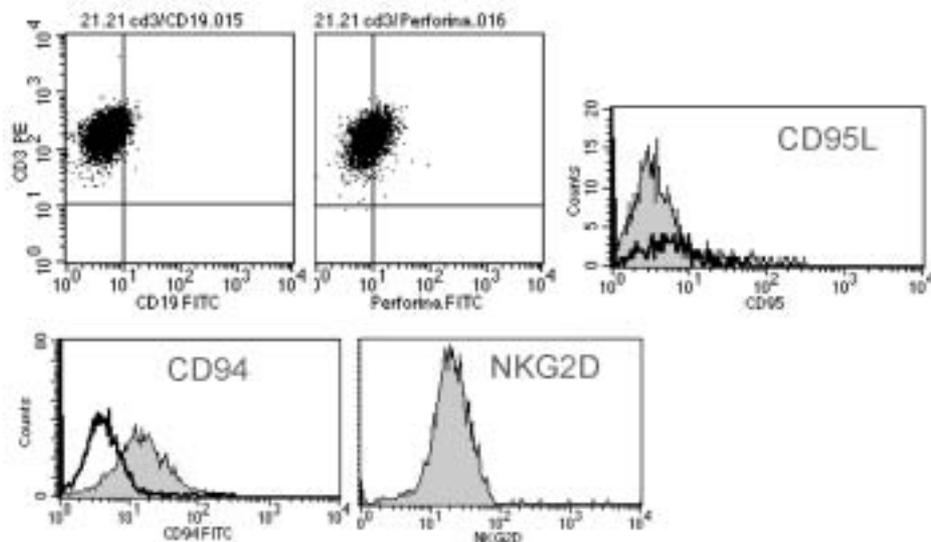
Los ensayos de inhibición de la citotoxicidad con anticuerpos anti-TCR $\alpha\beta$  (BMA031) demostraron que el reconocimiento de las Caco2, pero no de las K562, estaba mediado por el TCR. La inhibición por anticuerpos anti-CD8 demostró que el correceptor CD8 participa activamente en el reconocimiento de las dianas epiteliales, mientras que el AcMo contra la integrina CD103, como era de esperar en estas células negativas para esta integrina o el anticuerpo anti-CD4, no producen efecto alguno sobre el reconocimiento de estas células. La **figura 3.13** muestra un experimento representativo con 5 clones CD8<sup>+</sup> reactivos y uno no reactivo frente a Caco2. La ausencia de inhibición de la actividad de tipo NK por los anticuerpos anti-TCR y controles no está mostrada en la figura.



**Figura 3.13:** El reconocimiento de las dianas Caco2 por los clones CD8<sup>+</sup> está mediado por el TCR. Los AcMo anti-TCR (BMA031) y CD8 (143.44) inhiben el reconocimiento de la línea Caco2 por cinco clones citotóxicos V $\alpha$ 2. Anticuerpos anti-CD3 (no bloqueante), anti-CD4 y anti-CD103, se usaron como control negativo de inhibición. Arriba, a la izquierda, un clon CD8<sup>+</sup> sin reactividad (EC21.8).

### 3.5.3 Expresión de moléculas efectoras

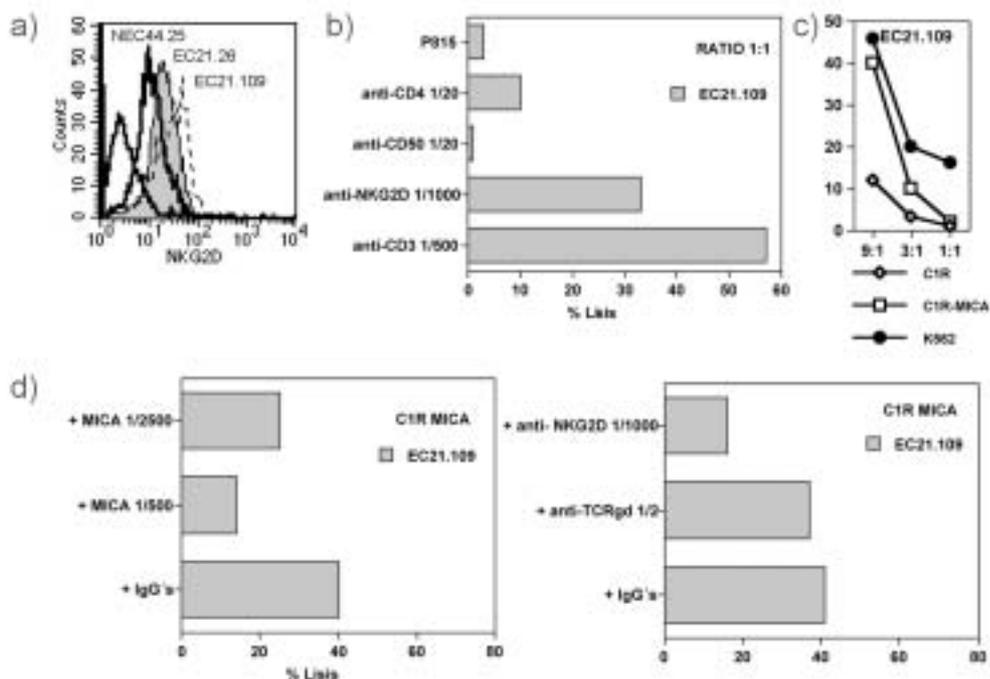
La expresión de moléculas relacionadas con la capacidad citotóxica, como perforina, CD95L (CD178), NKG2D y CD94, se analizó en los clones citotóxicos frente a Caco2. La **figura 3.14** muestra los resultados en un clon representativo, EC21.21 (V $\alpha$ 2V $\beta$ 8). Todos los clones analizados (n=3) expresaban perforina en el citoplasma, mientras que la expresión de CD95L (CD178) era indetectable. Por otra parte, todos (n=6) expresaban el receptor activador NKG2D y CD94. De las moléculas capaces de formar dímeros con CD94, se detectaron bajos niveles de mRNA por RT-PCR para NKG2A, mientras que NKG2C no fué detectada en ninguno de los 5 clones estudiados, EC21.3, .4, .6, .9 y .26 (datos no mostrados).



**Figura 3.14:** Expresión de moléculas efectoras por un clon V $\alpha$ 2V $\beta$ 8 EC21.21. Se observó la expresión intracitoplásmica de perforina y la ausencia de CD178. Tanto NKG2D como CD94 se expresaban en membrana.

### 3.5.4 Reconocimiento de MIC vía NKG2D

Los clones EC21 CD8<sup>+</sup> expresaron NKG2D a niveles más altos que el IEL NEC44.25, que es un clon con capacidad de lisar todas las dianas epiteliales (**figura 3.15a**). La capacidad citotóxica de estos clones V $\alpha$ 2 tanto vía TCR como NKG2D, se confirmó mediante ensayos de lisis redirigida en los que AcMo anti NKG2D y CD3 fueron capaces de inducir la lisis de la línea P815 por los clones CD8<sup>+</sup>V $\alpha$ 2 de EC21. La **figura 3.15b** muestra un experimento representativo con el clon EC21.109. Se pudo observar que la lisis mediada por NKG2D era de niveles altos, comparada con otros clones citotóxicos analizados anteriormente (ver capítulos 1 y 2). Es decir, que la incapacidad de los clones de lisar las dianas epiteliales HT29 y T84, no se debía a una disfunción de estos receptores. Por otra parte, se pudo también demostrar que estos clones eran capaces de lisar dianas MICA positivas a través de su interacción con NKG2D. Para ello, se utilizaron las células C1R transfectadas con MICA. Como se puede observar en la **figura 3.15c**, el clon EC21.109 era capaz de lisar las células C1R-MIC con eficiencia similar a las dianas NK K562 a una relación 9:1. Por otra parte, anticuerpos monoclonales dirigidos contra MIC o contra NKG2D inhibían la lisis de estas dianas con alta eficiencia. La especificidad de la interacción NKG2D/MIC se demostró por la incapacidad de los anticuerpos anti-TCR de inhibir la lisis en estas condiciones. Sin embargo, las dianas Caco2 que estas células reconocían específicamente, no expresaban MIC en su superficie (capítulo 4; figura 4.9). De esta manera, podíamos concluir que los clones reconocían un ligando desconocido en las células Caco2 a través de su TCR y que la expresión de otras moléculas efectoras funcionales como NKG2D no estaban relacionadas con la lisis de estas dianas.



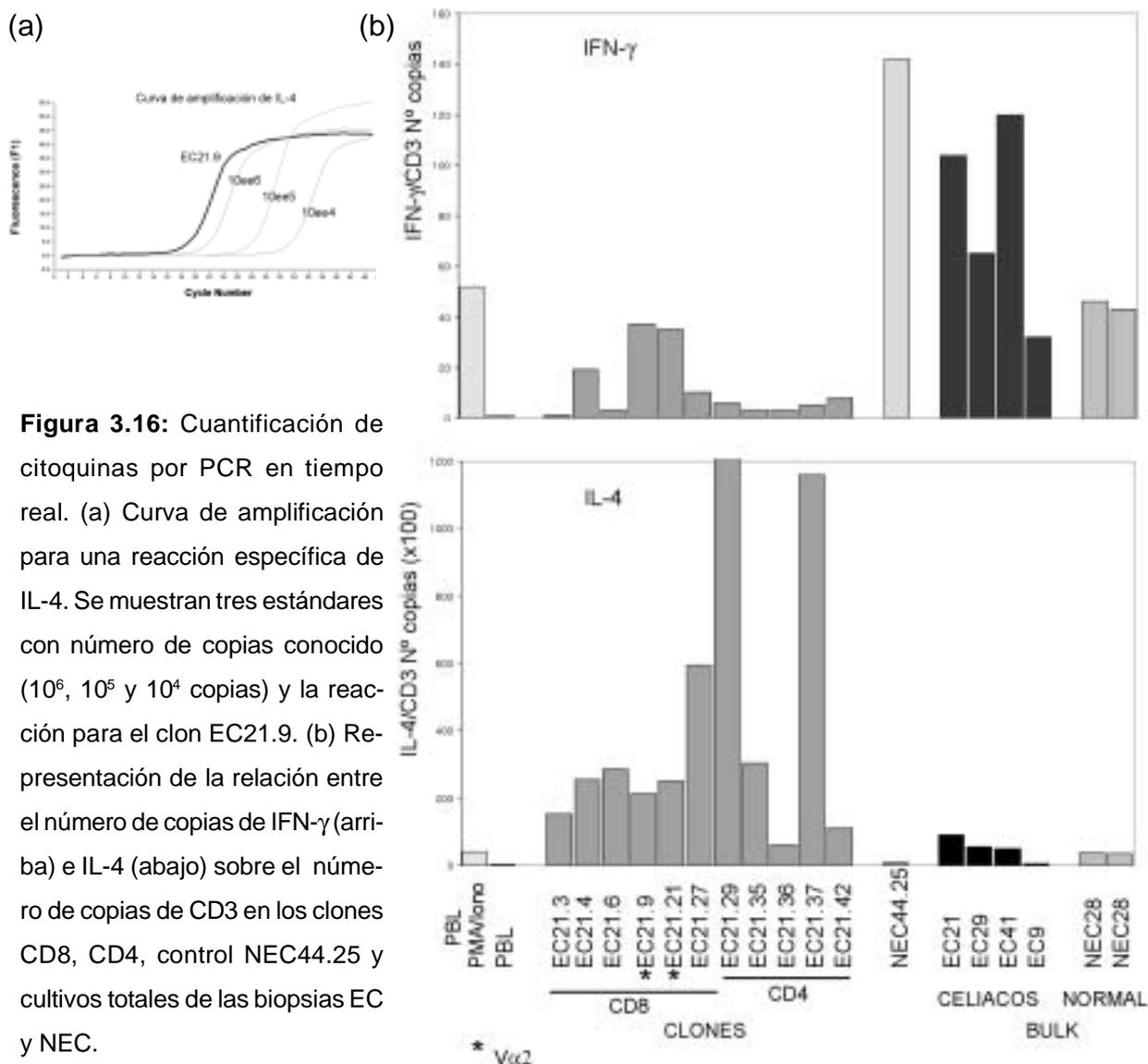
**Figura 3.15:** Reconocimiento de MICA vía NKG2D. (a) Expresión de NKG2D por clones V $\alpha$ 2 EC21. El clon IEL citotóxico anti-epitelio NEC44.25 se usó como control. (b) Lisis redirigida frente a la línea P815. El clon EC21.109 tiene capacidad de lisis a través de su TCR y también de NKG2D (ratio 1:1). (c) Reconocimiento de MICA via NKG2D. EL clon EC21.109 lisa específicamente la tranfectante para MICA. (d) La lisis es inhibida con AcMo anti MICA y NKG2D y no anti-TCR.

### 3.6 Citoquinas

#### 3.6.1 Cuantificación de citoquinas por PCR a tiempo real

La caracterización funcional de los clones EC21 V $\alpha$ 2 se continuó con la definición de su perfil de citoquinas. Se utilizó la PCR en tiempo real para cuantificar los niveles de transcripción de los genes de IL-4 e IFN- $\gamma$  sobre 11 clones (6 CD8<sup>+</sup> y 5 CD4<sup>+</sup>). Entre los CD8 se incluyeron 2 V $\alpha$ 2V $\beta$ 8 (EC21.9 y EC21.26). Las células se estimularon durante 1 h con PMA/Ionomicina. El clon NEC44.25 se usó como control para la producción de IFN- $\gamma$ . Como control de ambas citoquinas se utilizó cDNA de PBL estimulados en las mismas condiciones, así como los linfocitos totales expandidos de las 4 biopsias EC y las 2 biopsias NEC.

Los resultados se muestran en la figura 3.16. Ninguno de los 5 clones CD4 fué productor de IFN- $\gamma$  y 3 de ellos (EC21.29, EC21.35 y EC21.42) mostraron un perfil claramente Th2, expresando altos niveles de IL-4. El patrón de expresión de los clones CD8 mostró resultados inesperados. Todos ellos produjeron altos niveles de IL-4, y sólo los dos V $\alpha$ 2 expresaron también niveles medios de IFN- $\gamma$ , muy por debajo del control NEC44.25. El patrón de citoquinas de los cultivos *bulk* de las biopsias celíacas y no celíacas fué el esperado, con niveles muy altos de IFN- $\gamma$  y bajos pero detectables de IL-4. Esto indicaba que se había aislado una población minoritaria de clones CD8 productores de IL-4, pero que la producción de IL-4 no estaba ligada a la expresión del TCR V $\alpha$ 2/V $\beta$ 8 ni al reconocimiento de Caco2.



**Figura 3.16:** Cuantificación de citoquinas por PCR en tiempo real. (a) Curva de amplificación para una reacción específica de IL-4. Se muestran tres estándares con número de copias conocido (10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup> y 10<sup>4</sup> copias) y la reacción para el clon EC21.9. (b) Representación de la relación entre el número de copias de IFN-γ (arriba) e IL-4 (abajo) sobre el número de copias de CD3 en los clones CD8, CD4, control NEC44.25 y cultivos totales de las biopsias EC y NEC.

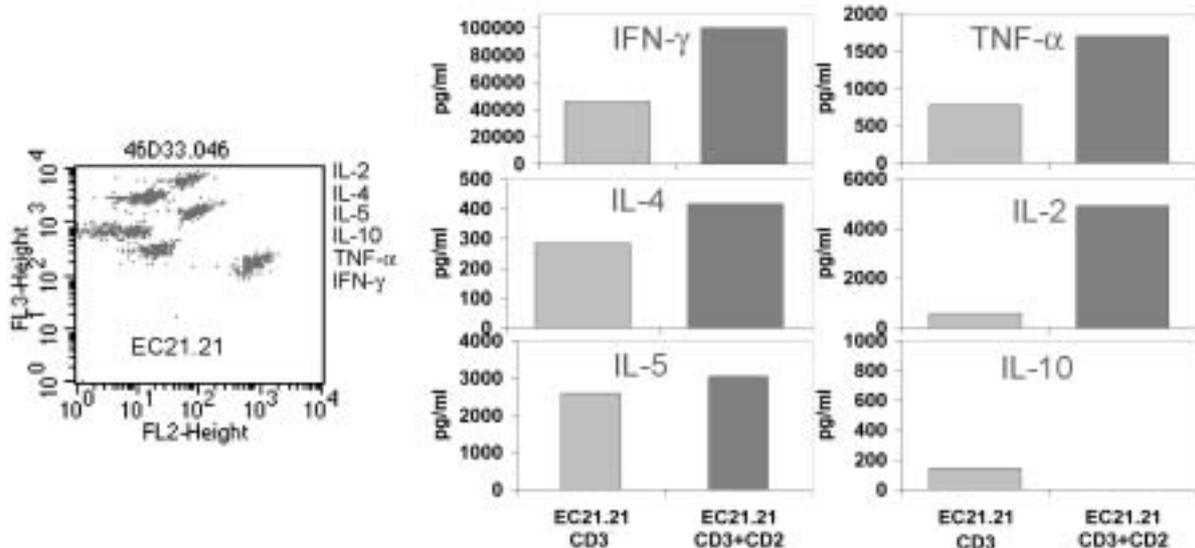
### 3.6.2 Cuantificación de citoquinas por CBA

Para confirmar estos resultados y analizar más allá el perfil de citoquinas, uno de los clones Vα2 (EC21.21) se estimuló con AcMo anti-CD3 y anti-CD2 durante 48 h y se analizó la secreción de cinco citoquinas diferentes al sobrenadante por CBA (ver capítulo 2). Los resultados se muestran en la **figura 3.17**.

Los resultados confirmaron la producción de altos niveles de IFN-γ que aumentaban con la estimulación. La producción de IFN-γ fue de 80000 pg/ml, ligeramente inferior al control NEC44.25 (>100.000 pg/ml). La producción de IL-4 se confirmó, ya que el clon producía aproximadamente 400 pg/ml, producción alta respecto a clones negativos (NEC44.25, 50 pg/ml, ver capítulo 1) y similar a otros clones positivos (entre 250 y 900 pg/ml, ver capítulo 2). Los resultados mostraron que el clon EC21.21 también producía TNF-α e IL-2 tras la estimulación con anti-CD3 + anti-CD2. También hubo alta producción de IL-5 pero no de IL-10.

El patrón de citoquinas para un clon CD8<sup>+</sup>V $\alpha$ 2 negativo (EC21.6), estimulado con PMA/Ionomicina también confirmó los resultados de RNA. Los resultados mostraron elevados niveles de IFN- $\gamma$  (> 5000 pg/ml) y muy altos de IL-4 (7300 pg/ml) e IL-2 (>5000 pg/ml). Las demás citoquinas se expresaron a niveles detectables (TNF- $\alpha$ : 2000 pg/ml, IL-5: 8500 pg/ml), menos la IL-10 (IL-10: 34 pg/ml) (figura no mostrada).

Se demostró pues la expansión de clones CD8<sup>+</sup> productores de IL-4 e IL-2, que no producen IL-10, en una biopsia celíaca.

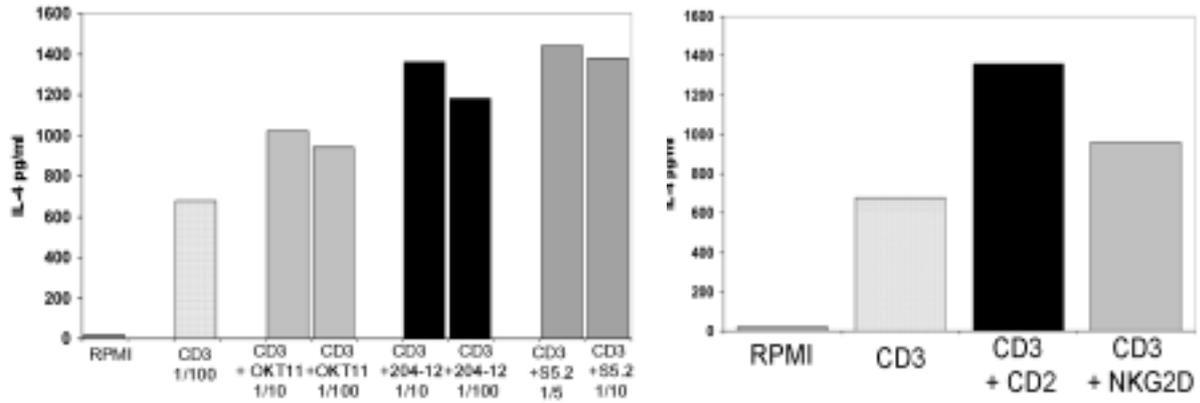


**Figura 3.17:** Determinación de citoquinas por CBA. (a) Representación del patrón de citoquinas por el clon EC21.21 luego de 48 h de estimulación con AcMo anti-CD3 (OKT3) y anti-CD2 (204-12). La intensidad de FL-2 indica la cantidad de citoquina liberada en el sobrenadante (dil1:20). (b) Cuantificación de las citoquinas producidas por el clon EC21.21. Se destaca la expresión de IFN- $\gamma$  (> 80000 pg/ml), de TNF- $\alpha$  (> 1500 pg/ml), IL-5 (3000 pg/ml), IL-4 (400 pg/ml) e IL-2 (>4000 pg/ml). El clon no produce IL-10.

### 3.6.3 Coestimulación a través de NKG2D

La coestimulación a través de CD2 se analizó por su capacidad de inducir la secreción de IL-4 en los clones estimulados con anti-CD3. Se utilizaron tres AcMo anti-CD2 (OKT11, 204-12 y el S5.2). De los tres, el 204-12 y el S5.2 fueron los que mejor estimulación produjeron al cabo de 48 h. OKT11, indujo menor síntesis de IL-4 (**Figura 3.18a**).

La capacidad coestimuladora de NKG2D, una molécula capaz de coestimular células CD8, se investigó en la inducción de secreción de IL-4 por los clones CD8 V $\alpha$ 2V $\beta$ 8. La producción de IL-4 inducida con AcMo anti-CD3 más anti-NKG2D fue baja, si bien superior a la inducida sólo por anti-CD3 (**Figura 3.18b**).



**Figura 3.18:** Coestimulación via CD2 y NKG2D. (a) Producción de IL-4 tras estimulación con anti-CD3 y -CD2. Los AcMo anti-CD2, 204-12 y S5.2, inducen mayor producción de IL-4 que el OKT11. (b) La coestimulación via AcMo anti- NKG2D (1D11) es inferior a la inducida via anti-CD2 (204-12). Se muestra un experimento realizado con el clon EC21.21.

*Discusión III*

---



Las células T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> que se expandieron de la biopsia celíaca EC21 después de un cultivo de larga duración, mostraron diferencias fenotípicas con los IELs de capítulos anteriores, la principal de las cuales es la ausencia de CD103. Por lo tanto, lo más probable es que se trate de una población de células CD8<sup>+</sup> de la lámina propia. A pesar que en la población total (bulk), el número de T  $\gamma\delta$  fue cercano al 30%, no se aislaron células  $\gamma\delta$  ni tampoco IELs  $\alpha\beta$  de esta biopsia EC21. Se expandió pues, de manera preferente en las condiciones del clonaje, una población de linfocitos CD8<sup>+</sup> productores de IL-4 y de IL-2, que posiblemente no permitió el crecimiento in vitro de las demás poblaciones. El 40 % de los LPL son CD8<sup>+</sup> (107).

Dos propiedades caracterizan a los linfocitos analizados en este capítulo: la clonalidad del TCR, el 50 % de los cuales expresa un único reordenamiento (TRVA2S3-J36-AC1) y la alta expresión de IL-4, además de IL-2.

Se sabe que la población de linfocitos T de la mucosa intestinal de individuos sanos es fuertemente oligoclonal, con varios segmentos V $\alpha$  y V $\beta$  representados. Predomina la utilización de ciertas cadenas V $\beta$  (1, 2, 3 y 6) con expansiones clonales en alguna de ellas (V $\beta$ 6) (162). Un examen en detalle del repertorio V $\beta$  de IELs y de LPL demostró que tanto en IELs como LPLs hay expansión clonal y que en ambas poblaciones, los clones expandidos utilizan diferentes cadena V $\beta$  (163). En nuestro estudio, el análisis por *spectratyping* de V $\alpha$ 2, V $\alpha$ 12 y V $\alpha$ 23 confirmó la limitada variabilidad de los reordenamientos, tanto en biopsias control (NEC28, NEC 40), como en las celíacas (EC9, EC21, EC29 y EC41). También demostramos la expansión clonal de algunos linfocitos en la mucosa.

Qué sucede en celíacos? El repertorio de los linfocitos T en la mucosa celíaca fue analizado por primera vez por Lahat y colaboradores, quienes no vieron restricción en el uso de cadenas V $\alpha$  y V $\beta$ , si bien estos son oligoclonales (201). Otros autores confirmaron más tarde en celíacos y en controles, que el repertorio es oligoclonal tanto en epitelio como en lámina propia, destacando un aumento en *biopsias celíacas de linfocitos V $\beta$ 8.1/2 en la lámina propia* (164). Estos linfocitos tenían un CDR3 (J2S7) que se repetía en algunos pacientes pero nunca en controles. Hay que destacar que, en nuestro estudio, la cadena V $\alpha$ 2 de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> analizados también se asocia a V $\beta$ 8 y además reordena en la región CDR3 el mismo segmento TRAJ2S7 (TRVB8S1-D2.1-J2S7-CB2). Los autores no determinaron las características funcionales en esta población, ni a qué cadenas V $\alpha$  se asocian los linfocitos V $\beta$ 8.1.

La elevada producción de IL-4 tras la estimulación in vitro con anti-CD3 y anti-CD2, es una característica fenotípica a resaltar en estos clones, que produjeron alrededor de 400 ng/ml por cada  $5 \times 10^4$  células. Este valor es cercano al que producen las células NKT V $\alpha$ 24 CD4<sup>+</sup>, estimuladas con  $\alpha$ -Gal-Cer (240). La IL-4 es una citoquina inmunoreguladora, asociada a respuestas de tipo Th2. Además induce un aumento de VCAM (CD106) en el endotelio y de HLA-II en monocitos, así como la disminución en la secreción de factores proinflamatorios como IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1. La producción de IL-4 por parte de los LPL produce una disminución en la proliferación de los IELs CD8<sup>+</sup> (155). En un modelo murino de injerto contra huésped, la depleción de IL-4 evitó el desarrollo de la hiperplasia de las criptas y el reclutamiento de IELs, sin afectar la atrofia de la vellosidad, indicando que tendría un papel selectivo (241). Sin embargo, la expresión de IL-4 *in*

*situ* en la mucosa celíaca y en biopsias control es baja. La liberación espontánea de la citoquina es cercana al 1% en IELs y en LPL (156). En mucosa normal se han detectado células productoras, tanto por histoquímica como por PCR en tiempo real y en celíacos la IL-4 parece ser minoritaria (80).

Otra de las diferencias encontradas en la población CD8<sup>+</sup> CD103<sup>-</sup>, respecto a los IELs CD103<sup>+</sup> es la incapacidad de lisis de algunas líneas epiteliales. *In situ*, la falta de interacción directa de estas células con el epitelio justificaría esta falta de reactividad. La proximidad de las células de la lámina propia con el epitelio podría conllevar otro tipo de interacción, quizá a través de la producción de citoquinas. La única reactividad se limitó a los clones V $\alpha$ 2V $\beta$ 8 y estaba restringida al reconocimiento relativamente ineficiente de una de las líneas epiteliales, Caco2, aunque el TCR y CD8 estaban involucrados en el reconocimiento. La existencia de células con un reordenamiento específico del TCR, como las V $\alpha$ 24J18 (NKT) y las V $\alpha$ 7.2J33 (MAIT), que reconocen MHC-no clásicos, avalan la posibilidad de que otros receptores puedan identificar ligandos monomórficos. No sabemos cuál es el ligando que esta población reconoce pero teóricamente estaría expresado en las células Caco2 y no en las otras líneas epiteliales. La alta expresión de IL-4 por células CD8<sup>+</sup> no es habitual, pero sí una característica de las células NKT, que poseen un TCR restringido (V $\alpha$ 24/V $\beta$ 11) y que se estimulan con glicolípidos asociados a CD1d (242). No se trata del mismo tipo de células ya que las células V $\alpha$ 2 expresan un receptor diferente y tampoco reconocen CD1 (datos no mostrados).

Es interesante destacar que los clones V $\alpha$ 2 tienen alta expresión de NKG2D, a través del cual son capaces de redirigir la lisis y de reconocer MIC en células transfectadas. Sin embargo, no lisan a las líneas epiteliales que expresan MIC (HT29 y T84), ni se puede asociar la lisis de la línea Caco2 (MIC negativa) al reconocimiento de MIC. Posiblemente la falta de reconocimiento via NKG2D se deba a que el complejo NKG2D-MICA no alcance el umbral necesario de activación por una insuficiente expresión de MICA en las líneas epiteliales. La presencia de receptores inhibidores (CD94/NKG2A) también podrían estar regulando negativamente a NKG2D, ya que tienen más afinidad por sus ligandos que los activadores (243,144).

En resumen, la clonalidad de esta población en la mucosa celíaca sugiere la presencia de un ligando responsable de su expansión, que podría estar aumentado en el epitelio celíaco. La demostración por otros autores de la existencia de células V $\beta$ 8/2.1 expandidas en la mucosa de enfermos celíacos, pero no en controles, sugeriría una función de estas células en el desarrollo o control de la enfermedad. La escasez de células productoras de IL-4 en la lámina propia, no descarta que potencialmente sean importantes en situaciones patológicas. La producción de IL-2 sustenta la posibilidad de que su expansión sea independiente de la presencia de otras células colaboradoras.

## *Capítulo IV*

*IELs γδ en Enfermedad Celíaca*

---



*Estudio de las células  $\gamma\delta$  intraepiteliales en la enfermedad celíaca.*

#### **4.1 Linfocitos T $\gamma\delta$ en biopsias celíacas**

La última población de la mucosa intestinal que se estudió a nivel clonal fueron las células  $\gamma\delta$ . Estas células se expanden en la mucosa celíaca y en las biopsias estudiadas correspondieron a porcentajes de entre 1 y 31 % en las biopsias celíacas y entre el 1 y el 2 % en las biopsias no celíacas (ver prólogo). Se clonaron las biopsias EC9 y NEC40, en las que las células  $\gamma\delta$  representaban el 31% y el 1% respectivamente de la población CD3+ (ver figura 0.1, prólogo).

#### **4.2 Clonación de las biopsias EC9 y NEC40**

De la biopsia EC9 se obtuvieron un total de 80 clones, de los cuales 19 (23,7%) expresaban el TCR  $\gamma\delta$ . Sólo 2 (4%) clones de un total de 48 aislados a partir de la biopsia NEC40 expresaban este receptor (ver **tabla 0.2**, prólogo). La **figura 4.1** muestra la expresión de TCR, CD103, CD4/CD8 en estos clones. En general, el crecimiento de los clones  $\gamma\delta$  fue variable y con una tasa de replicación inferior a los clones  $\alpha\beta$ . Aún así se han llegado a criopreservar más de 180 viales de los diferentes clones de células T  $\gamma\delta$ .

La **tabla 4.1** resume el fenotipo de superficie de 16 de estos clones, junto con el del clon control CD8+ TCR  $\alpha\beta$  NEC44.25. La **figura 4.2** muestra la expresión de algunas de las moléculas estudiadas en dos clones celíacos representativos (EC9.80, EC9.65) y uno no celíaco (NEC40.25), además del clon control NEC44.25.

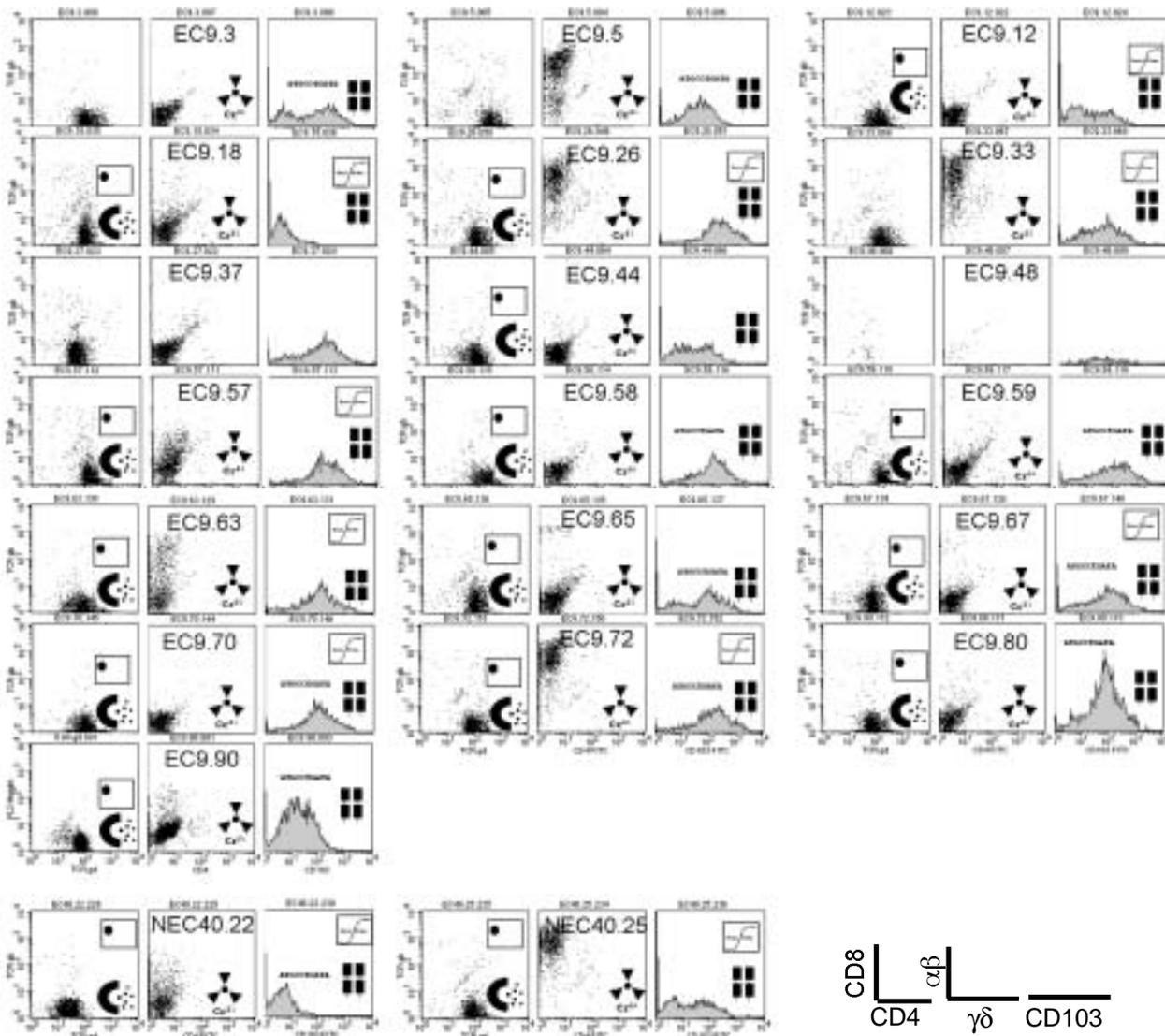
El 81% de los linfocitos  $\gamma\delta$  EC9 eran CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>, y el 19% restante (3 clones) expresaban el homodímero CD8 $\alpha\alpha$ . Los 2 clones NEC40 eran CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>. La expresión de CD103, en todos menos uno (EC9.18) de los clones  $\gamma\delta$  demostró claramente su origen epitelial, lo cual indicaba que las células  $\gamma\delta$  expandidas en la mucosa celíaca era una población de IELs.

Entre los clones aislados, tres (EC9.65, EC9.67 y EC9.90) fueron CD28<sup>+</sup> y todos expresaban CD54, CD50, CD58, CD11- $\alpha$  (no se muestra) y CD2. Ninguno expresaba CD16 y sólo uno de los dos clones NEC40 expresaba CD56 (NEC40.25).

La expresión de CD94 en la superficie de los clones  $\gamma\delta$  fue negativa en todos los casos. Esta molécula dimeriza en la superficie celular con dos proteínas de la familia NKG2: NKG2A y NKG2C, que forman con CD94 receptores inhibidor y activador, respectivamente. Aún siendo negativa la expresión de superficie de CD94, se analizó por RT-PCR la síntesis de NKG2A y C, ya que se ha reportado mensajero de estas moléculas en IELs  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> CD94<sup>-</sup> (244). Todos los clones  $\gamma\delta$  eran negativos para NKG2A, mientras que 10/16 expresaban mRNA para NKG2C (**figura 4.3**). La molécula CD94 y el mRNA de NKG2A y NKG2C se expresaban en el clon control CD8 TCR  $\alpha\beta$  NEC44.25. Por otra parte, todos los clones  $\gamma\delta$  expresaron el receptor activador NKG2D, que no dimeriza con CD94.

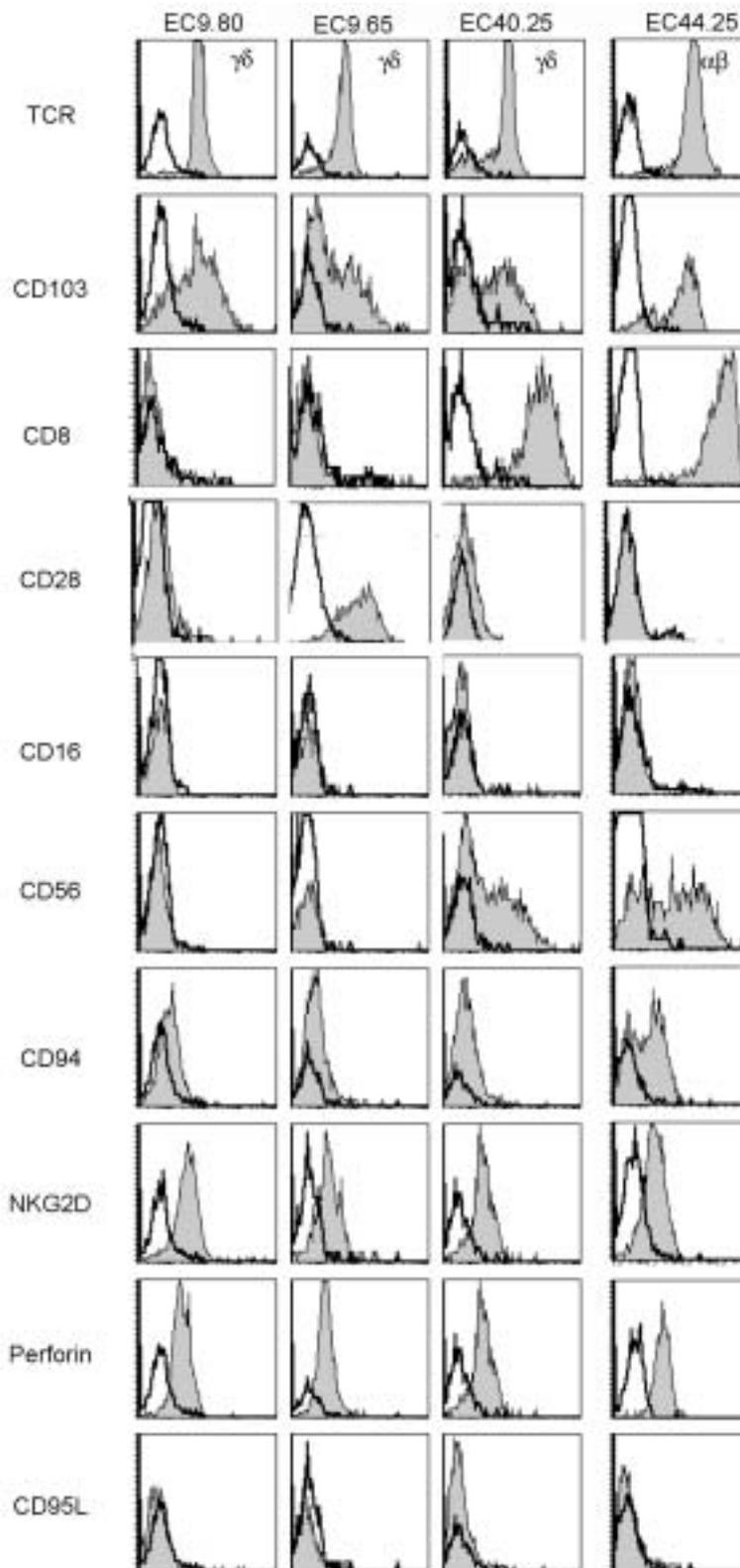
Entre las moléculas efectoras, se detectó perforina en todos los clones analizados, mientras que CD178 (CD95L) no se detectó en la superficie de ninguno de ellos en el momento de realizar los ensayos funcionales. La falta de expresión de CD178 en membrana es esperable, ya que

CD178 se escinde (*shedding*) de la membrana celular durante el cultivo (245). Por RT-PCR, la mayoría de los clones expresó CD178 tras la activación con PMA/Ionomicina, pero fueron negativos luego de siete días de cultivo, en las condiciones habituales de crecimiento (datos no mostrados).

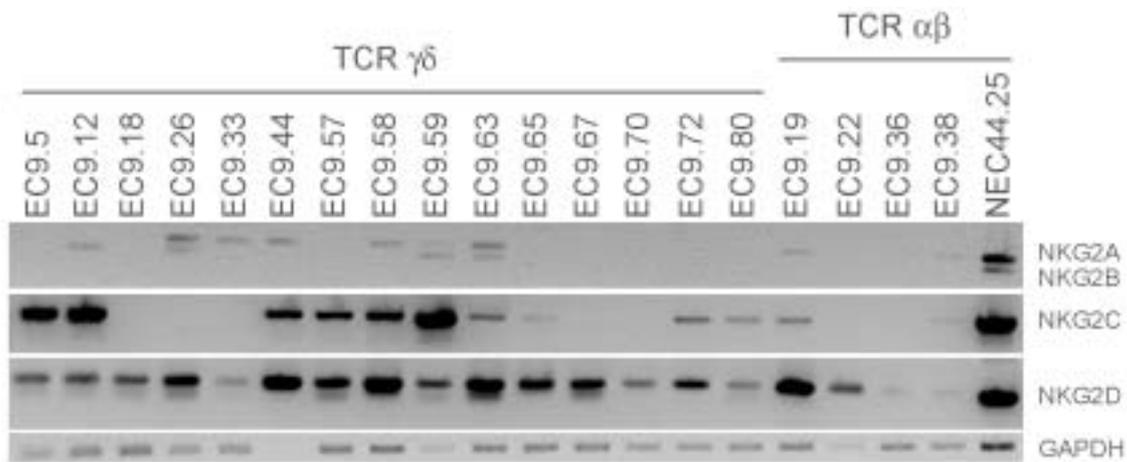


**Figura 4.1:** Fenotipo de 21 clones TCR  $\gamma\delta$  aislados de dos biopsias diferentes. Expresión en superficie de los marcadores TCR  $\alpha\beta/\gamma\delta$ , CD4/CD8 y CD103. Sólo 5 clones fueron CD8 $\alpha$  positivos. Todos menos uno (EC9.18) expresaron CD103. Las referencias insertadas en los dot-blot indican los estudios que se han realizado en cada clon:

Fenotipo; citotoxicidad; TCR- RT-PCR; secuenciación TCR; Citoquinas CBA; Citoquinas Real-Time PCR



**Figura 4.2:** Fenotipo de superficie de tres clones  $\gamma\delta$  comparados con un IEL CD8<sup>+</sup> TCR  $\alpha\beta$ . EC9.80 y EC9.65 son dos clones con y sin reactividad epitelial respectivamente, aislados de la biopsia EC9 y NEC40.25 es un clon sin reactividad epitelial obtenido de una biopsia no celíaca, todos CD103<sup>+</sup>. La figura muestra la expresión de CD28, NKG2D y perforina intracitoplasmática. Todos los clones fueron negativos para CD16, CD178 (CD95L) y CCR7. La expresión de CD94 fue negativa (excepto el control NEC44.25). Los clones NEC40.25 y NEC44.25 expresaron CD56. NEC40.25 fue positivo para el homodímero CD8 $\alpha\alpha$ .



**Figura 4.3:** Patrón de expresión de mRNA para los receptores NKG2A/B, NKG2C y NKG2D. Quince clones  $\gamma\delta$  fueron negativos para la isoforma NKG2A, mientras que 9/15 fueron positivos para NKG2C. Todos los clones  $\gamma\delta$  fueron positivos para NKG2D, con ligeras variaciones cuantitativas. Los clones CD8<sup>+</sup> (desde 9.19 a 9.38) mostraron positividad pero más variabilidad en la expresión del mRNA de NKG2D. Como control positivo de todas las cadenas se utilizó el IEL CD8<sup>+</sup> NEC44.25.

Clon $\gamma\delta$	TCR $\gamma$	TCR $\delta$	CDR3 aa/J	CD8 $\alpha$	CD 103	CD 28	CD 16	CD 56	CD 94	NKG *2C	NKG 2D
9.3	1	1	11/J1	-							
9.72	1	1	13/J1	+	+	-	-	-	-		+
9.5	1	1	14/J1	+	+					+	
9.80	1	1	16/J1	-	+	-	-	-	-	+	+
9.59	1	1	7/J2	-	+	-	-	-	-	+	+
9.58	1	1	11/J1	-	+	-	-	-	-	+	+
9.65	1	1	12/J1	-	+	+	-	-	-	-	+
9.67	1	1	12/J1	-	+	+	-	-	-	-	+
9.90	1	1	11/J1	-	+	+	-	-	-		+
9.26	1	2		+	+						+
9.57	1	2		-	+					+	+
9.18	1	3		-	-						+
9.63	1	3		-	+						+
9.44	1	3		-	+					+	+
9.12	1	5		-	+					+	+
9.70	1	7	9/J1	-	+						+
40.22	1	1	10/J1	-	-					+	+
40.25	2	2		+	+			+		+	+
44.25	n/a	n/a	n/a	+	+		+	+	+	+	+

**Tabla 4.1:** Fenotipo de superficie de clones T  $\gamma\delta$ .

Las dos primeras columnas representan los genes  $\gamma$  y  $\delta$  utilizados por el TCR de cada clon. La tercera columna representa el CDR3, indicándose la longitud total y el segmento J usado. En el resto de las columnas, se representa expresión positiva (+), negativa (-) o no determinada (en blanco). n/a, no aplicable. \*La expresión de NKG2C fue analizada por RT-PCR.

### 4.3 Heterogeneidad del repertorio TCR $\gamma\delta$ en los clones T aislados de la mucosa intestinal

#### 4.3.1 Repertorio $V\gamma$ y $V\delta$

Se estudió el repertorio de genes variables TRVG y TRVD por RT-PCR. Los resultados se muestran en la **tabla 4.1**. Se utilizaron cebadores específicos para las regiones  $V\gamma 1-4$  y  $V\delta 1-8$ , primero sobre la población total de los cultivos de las 4 biopsias EC y de las 2 NEC. Las familias  $V\delta 1, 3, 5$  y  $7$  fueron las más abundantes en las biopsias EC, si bien  $V\delta 2$  y  $V\delta 4$  se detectaron a bajo nivel en la biopsia EC21. Sólo las familias  $V\delta 1, 2$  y  $3$  se amplificaron en las biopsias NEC (datos no mostrados).

Todos los clones expresaban  $V\gamma 1$ , excepto uno (NEC40.25) que era  $V\gamma 2$  (**tabla 4.1**). La expresión de  $V\delta$  fue mucho más variable: de los 16 clones EC, 9 eran  $V\delta 1$ , 2  $V\delta 2$ , 3  $V\delta 3$ , 1  $V\delta 5$  y 1  $V\delta 7$ . Uno de los clones NEC era  $V\delta 1(V\gamma 1)$  y el otro  $V\delta 2(V\gamma 2)$ . No se detectaron las familias  $V\delta 4$  ni  $V\delta 6$  en ninguno de los clones, confirmando la ausencia de estas familias en la población total.

La combinación  $V\gamma 1V\delta 1$  fue la predominante entre los clones, con un 55% (10/18). Sólo uno de los clones era  $V\gamma 2V\delta 2$  (NEC40.25), un TCR predominante en células  $\gamma\delta$  de sangre periférica, que se aisló de una biopsia no celíaca. Sin embargo este clon expresaba CD103, lo que indicaba que era de origen epitelial, no provenía de periferia.

Es interesante notar que uno de los clones expresaba  $V\delta 7$  asociado a  $V\gamma 1$  (EC9.70). Hasta el momento sólo se ha reportado un clon que expresa  $V\delta 7$ , aislado de timo (246). El clon EC9.18, que no expresa CD103 y por lo tanto podría tener origen periférico, expresaba un TCR con los segmentos variables  $V\gamma 1/V\delta 3$ .

#### 4.3.2 Análisis del CDR3 en el TCR de los clones $V\delta 1$

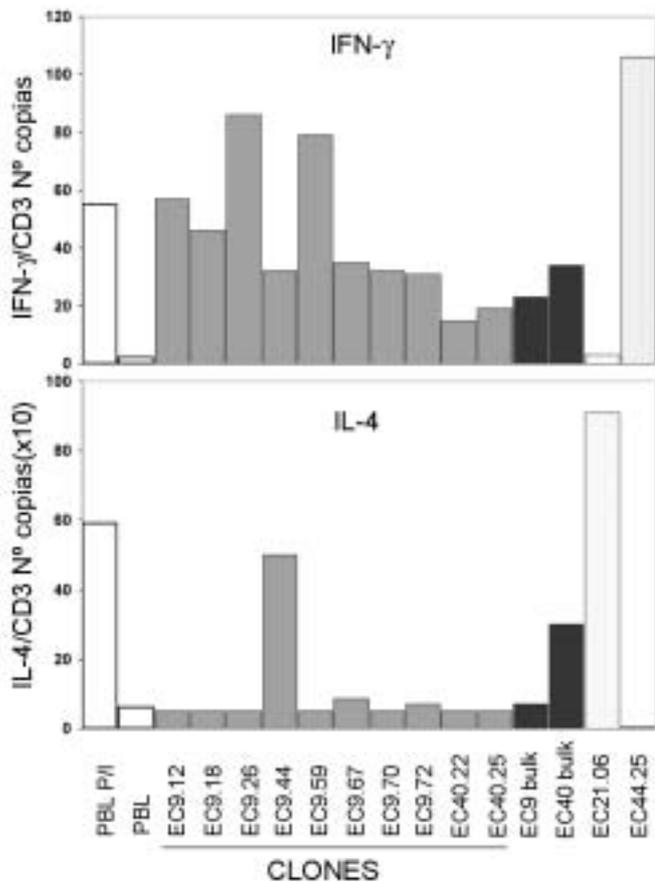
Seguidamente se secuenciaron las regiones CDR3 de las familias  $V\delta 1$  (**tabla 4.2**). Casi todos los clones, excepto uno, utilizaron el segmento de unión TRDJ1. EC9.59 utilizó la región TRDJ2. También se encontraron algunas secuencias TRDD1 comunes entre los clones. Se observó variabilidad en el uso de los segmentos TRDD2 y diversidad dada por la adición de nucleótidos sin molde (N region). La secuencia de la región CDR3 fue idéntica en sólo dos clones (EC9.65 y EC9.67) y el tamaño del CDR3 en esta serie de clones  $V\delta 1$  fue muy variable.

	V $\delta$	CDR3	J $\delta$
EC9.3	CTT GGG L G	GAA CGT GGC <u>CTT CCT ACG</u> GTA CTT ACG CCC E Y G L P T V L T P	GAT AAA DJ1 D K
EC9.5	CTT GGG L G	GAC TAC GGG GGC GGC CCC <u>CCT TAC</u> TTT GCG ATG GGC N Y G G G P P Y F A M G	ACC GAT AAA DJ1 T D K
EC9.58	CTT GGG L G	GAA CAT <u>CCT TCC TAC</u> GGG GGG ATA CGG GGC E H P S Y G G I R G	GAT AAA DJ1 D K
EC9.59	CTT GGG L G	GAT TCC <u>TAC CTA CCT</u> D S Y L P	TTG ACA GCA DJ2 L T A
EC9.65	CTT GGG L G	GAA ATC CCT CTC <u>TGG GGG ATA CGT</u> AGG GCC E I P L W G I R R A	ACC GAT AAA DJ1 T D K
EC9.67	CTT GGG L G	GAA ATC CCT CTC <u>TGG GGG ATA CGT</u> AGG GCC E I P L W G I R R A	ACC GAT AAA DJ1 T D K
EC9.72	CTT GGG L G	GAA CTA GGA ACC TCC ACC AGA CCC TTA GCT ACG E L G T S T R P L A T	ACC GAT AAA DJ1 T D K
EC9.80	CTT GGG L G	GAA TAC CAA CCC CCG AAC <u>TGG GGG</u> GAT ACC CGA CCA GTG TAC ACC GAT AAA DJ1 E Y Q P P N W G D T R P V Y T D K	
EC9.90	CTT GGG L G	GAA CCC <u>CTT</u> CTC CAC <u>TGG GGG</u> ATT GAG GGG E P L L H W G I Q G	AAT AAA DJ1 D K
EC40.22	CTT GGG L G	GAA CTA GGC TGG <u>CCG GGG GAT AAC</u> E L A W P G D N	ACC GAT AAA DJ1 T D K

**Tabla 4.2:** Secuencias de la región CDR3 en los clones TCR $\delta$ 1. En la parte izquierda (gris claro), la secuencia correspondiente a la región V $\delta$ . La parte del medio corresponde a las distintas secuencias de la región CDR3, con una estructura N(D)N: las secuencias derivadas de los segmentos D1 (CCTTCCTAC) están sombreadas y subrayadas y las del segmento D2 (CTGGGGGATACG) subrayadas. La columna de la derecha corresponde a las secuencias JD (JD1 o JD2).

#### 4.4 Producción de citoquinas y expresión de receptores de quimiocinas

Para caracterizar funcionalmente a los clones, se estudió el perfil de citoquinas y la expresión de receptores de quimiocinas. La técnica de PCR a Tiempo Real se utilizó como primera aproximación para cuantificar la expresión de citoquinas en la población total aislada de las seis biopsias (4 EC y 2 NEC) y en algunos clones (**figura 4.4**). En las biopsias analizadas (“bulk” en la figura), la expresión de IFN- $\gamma$  dominó en todos los casos pero en todas se detectó IL-4, a niveles ligeramente inferiores que en los PBLs activados (ver también figura 3.16). Los resultados de los clones  $\gamma\delta$  demostraron una tendencia en favor de perfiles de tipo Th1, con expresión de IFN- $\gamma$  en diez clones  $\gamma\delta$  contra un clon (EC9.44) que expresó IL-4 a niveles similares a los PBL activados. Los niveles de IFN- $\gamma$  fueron siempre inferiores que los expresados por clones CD8+ (ver control NEC44.25 de la figura 4.3 y figura 3.16).

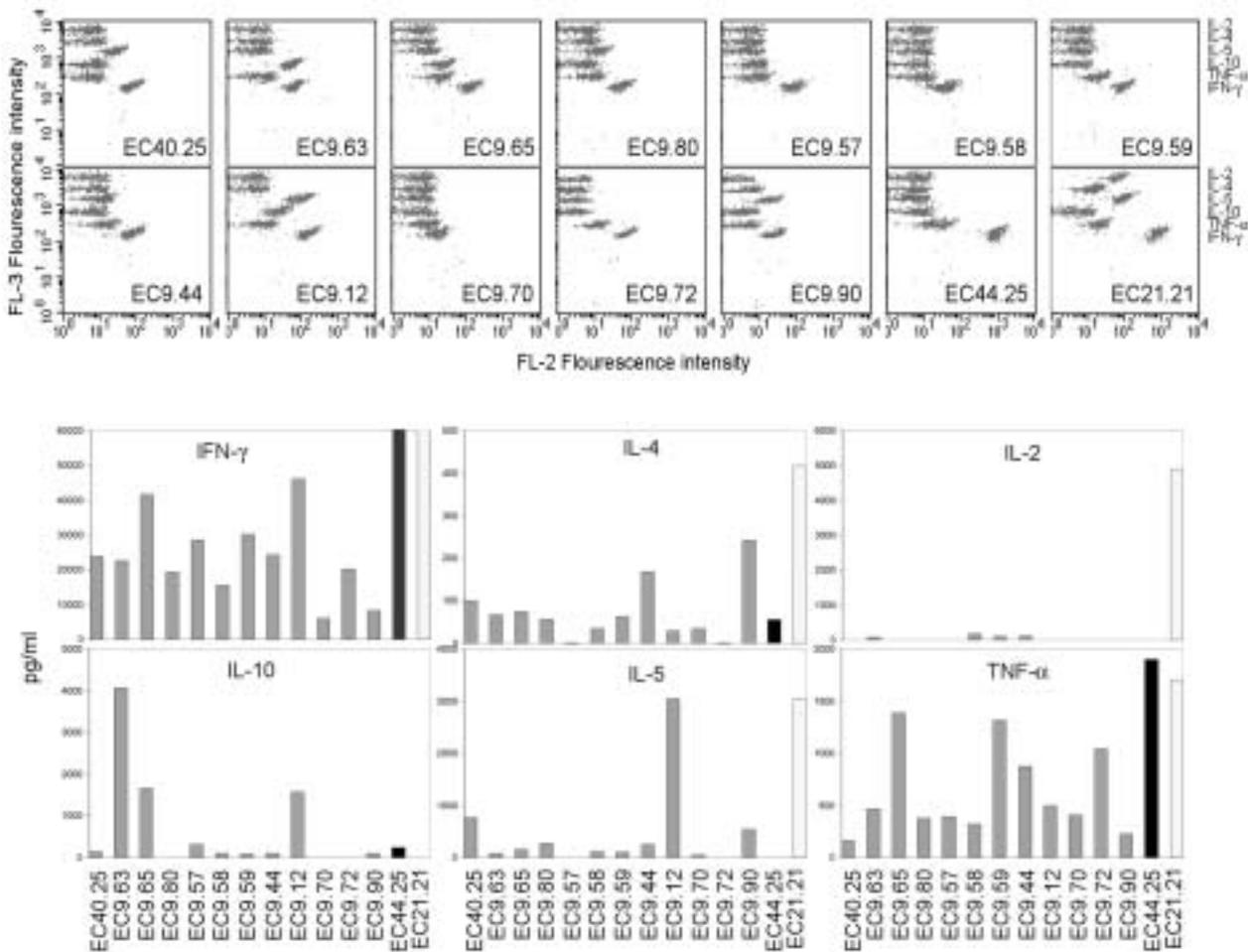


**Figura 4.4:** Cuantificación de citoquinas por PCR en Tiempo Real. Relación entre el nº de copias de IFN- $\gamma$  e IL-4 sobre el nº de copias de CD3. Todos los clones  $\gamma\delta$  analizados mostraron un elevado nº de copias de IFN- $\gamma$ . Sólo en uno de ellos se detectó cDNA para IL-4 (EC9.44). Los clones NEC44.25 y EC21.6 son clones CD8<sup>+</sup> utilizados como control de síntesis de IFN- $\gamma$  e IL-4 respectivamente. En la figura se muestran también los resultados obtenidos a partir de los cultivos de las dos biopsias de las que se aislaron los clones estudiados (EC9 y NEC40 "bulk").

#### 4.4.1 Determinación y cuantificación de citoquinas por citometría de flujo

Para intentar definir el patrón de síntesis de citoquinas por los distintos clones, determinamos por CBA™ la producción de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-4, IL-5 e IL-2 en el sobrenadante de clones de células T estimuladas durante 48hs con con anticuerpos anti-CD3 (OKT3) y anti-CD2 (204-12). Los resultados se muestran en la **tabla 4.3** y en las **figura 4.5**.

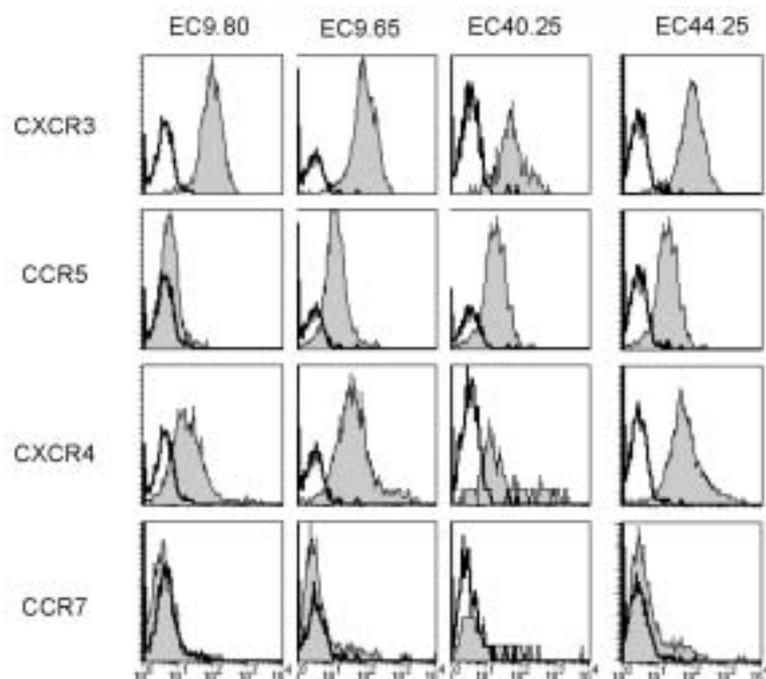
Confirmamos la producción de IFN- $\gamma$  por todos los clones tras la estimulación. Los clones  $\gamma\delta$  (50.000 células en 100  $\mu$ l de medio de cultivo) secretaron entre 15.000 y 50.000 pg/ml, con la excepción del clon V $\delta$ 7, EC9.70 (5.000 pg/ml). El clon NEC44.25, TCR  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup>, utilizado como control positivo, produjo en las mismas condiciones, más de 100.000 pg/ml. La producción basal (sin estimulación) estuvo entre 200 y 900 pg/ml en todos los casos. Todos los clones, menos el NEC40.25, produjeron TNF- $\alpha$ . Los niveles de síntesis fueron menores que los de IFN- $\gamma$  (entre 300 y 1700 pg/ml, con el control positivo en 1900 pg/ml) y más elevados en los clones EC9.59, EC9.65 y EC9.44. La IL-2 se detectó en el control EC21.21, pero en ninguno de los clones  $\gamma\delta$ . La producción de IL-4 fue muy baja, incluido el control (460 pg/ml vs 60 pg/ml en ausencia de estímulo) y sólo se detectó en el sobrenadante de dos clones, EC9.44 (168 vs 39 pg/ml) y EC9.90 (242 pg/ml vs valor indetectable), confirmando los resultados de expresión de mRNA. Otras citoquinas detectadas fueron IL-5 (EC9.44, EC9.12, EC9.90 y NEC40.25) e IL-10 (EC9.65, EC9.67, EC9.90 y EC9.12).



**Figura 4.5:** Patrón de secreción de citoquinas producidas por los clones T  $\gamma\delta$ . La determinación de citoquinas por CBA™ se realizó en sobrenadantes (dil:1:20) de células T estimuladas 48 h con AcMo anti-CD3 (OKT3) y anti-CD2 (204-12). (a) Cada figura representa el patrón de secreción de cada clon luego de la estimulación. Los puntos desplazados hacia la derecha representan secreción positiva. La lista de las citoquinas se muestran a la derecha de cada figura. La intensidad de fluorescence en FL-2 representa la cantidad de citoquina en cada sobrenadante. (b) Cuantificación directa de las figuras mostradas arriba, calculados según los estándares del fabricante. Los resultados muestran en todos los clones alta expresión de IFN- $\gamma$  y baja de TNF- $\alpha$ . Algunos clones expresaron IL-4, IL-10 o IL-5, mientras que ninguno expresó IL-2. Los niveles de secreción fueron muy variables. Como control positivo se utilizaron los clones CD8<sup>+</sup> NEC44.25 y EC21.21.

La expresión de los receptores de quimiocinas CXCR3 y CCR5, asociados al patrón Th1 se determinó, igual que CXCR4, receptor de SDF-1 que en células  $\alpha\beta$  está expresado en las células preinmunes, y CCR7, presente en las células T de memoria periféricas (T<sub>cm</sub>). Los resultados confirmaron la expresión de CXCR4 y el marcador de Th1, CXCR3, en todos los clones (**figura 4.6** y **tabla 4.3**). Sin embargo, la expresión de CCR5 fue variable. De 12 clones  $\gamma\delta$  estudiados, cinco eran negativos para CCR5 y 7 expresaban CCR5 a niveles relativamente bajos. Sólo un clon (EC9.12, V $\gamma$ 1/V $\delta$ 5) mostró alta expresión de este receptor, comparable a la de los clones CD8<sup>+</sup> (datos no mostrados). CCR7, generalmente presente en células de memoria sin funciones

efectoras (central memory cells), no se expresó en ninguno de los clones analizados. Es importante recalcar que la expresión de CXCR4 en todos los clones  $\gamma\delta$  (excepto EC9.90) se contrapone con la ausencia de este marcador en la mayoría de los IELs CD8<sup>+</sup> TCR  $\alpha\beta$  que hemos analizado, aunque sí se expresa en el clon NEC44.25, utilizado como control (ver figura 4.6 y capítulo 2).

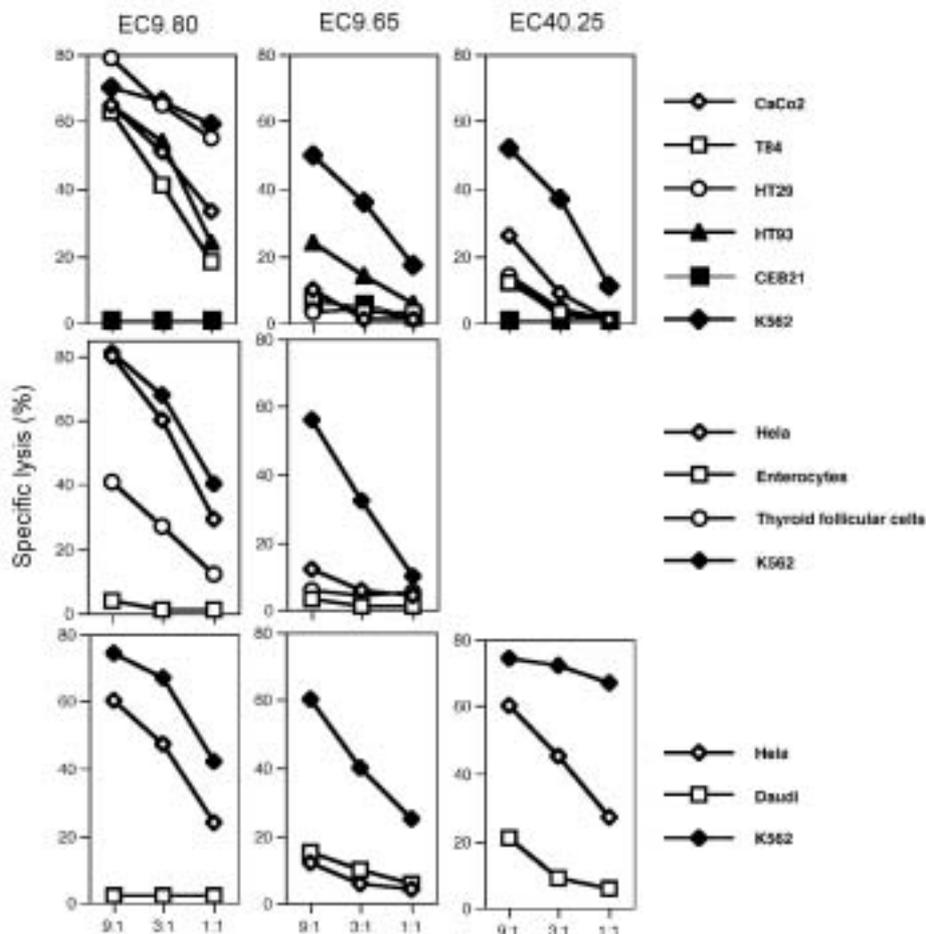


**Figura 4.6:** Expresión de receptores de quimiocinas por clones de células T  $\gamma\delta$ . La figura muestra la expresión de los receptores de quimiocinas CXCR3, CCR5, CXCR4 y CCR7 en tres clones  $\gamma\delta$  y en el control NEC44.25.

#### 4.5 Reconocimiento de líneas epiteliales por linfocitos T $\gamma\delta$ de mucosa intestinal

El análisis de la función celular de estos clones se continuó mediante ensayos de citotoxicidad frente a un panel de dianas celulares de distinto origen, incluyendo líneas epiteliales (HT29, T84, Caco2, HT93) y células primarias de epitelio intestinal (enterocitos y foliculares tiroideas) y hematopoyéticas: HeLa, Daudi, B-LCLs y K562. Todos los clones T  $\gamma\delta$  mostraron actividad tipo-NK contra las células K562, y ninguno contra las B-LCLs. Sólo un clon, NEC40.25 (V $\delta$ 2), mostró baja actividad contra las células Daudi, coincidiendo con datos que demuestran reactividad de las células V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 de sangre periférica contra esta línea linfoblástide (247). De 18 clones T  $\gamma\delta$  probados, 12 mostraron actividad citotóxica frente a las líneas epiteliales de colon HT29, T84 y CaCo 2 y las no intestinales HeLa y HT93. Entre los clones reactivos, pudimos diferenciar dos niveles de citotoxicidad contra las células epiteliales: i) alta (40-80% de lisis, relación E:T, 9:1) en EC9.3, 9.5, 9.70, 9.72 y 9.80 y ii) baja (20-40% de lisis) para los clones EC9.18, 9.26, 9.57, 9.58, 9.59, 9.63 y NEC40.22. Sin embargo, la línea NEC40.25 que no reconocía epitelio intestinal, lisaba las células HeLa. Un ejemplo de un clon reactivo V $\delta$ 1 (EC9.80), un clon no reactivo V $\delta$ 1 (EC9.65) y uno no celíaco y no reactivo V $\delta$ 2 (NEC40.25), se muestra en la **figura 4.7**. Ninguno de los clones  $\gamma\delta$  reconocieron enterocitos y mostraron una actividad citotóxica baja o negativa frente a las células foliculares tiroideas.

Todos los linfocitos  $\gamma\delta$  expresaban perforina, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , es decir tenían capacidad citotóxica constitutiva. Sin embargo, no todos eran citotóxicos para las dianas utilizadas y el nivel de lisis frente a células epiteliales se correlacionaba mejor con otros parámetros celulares, ya que todos los clones no reactivos producían IL-10, IL-5 y/o IL-4, todas ellas citoquinas de tipo Th2 o reguladoras.



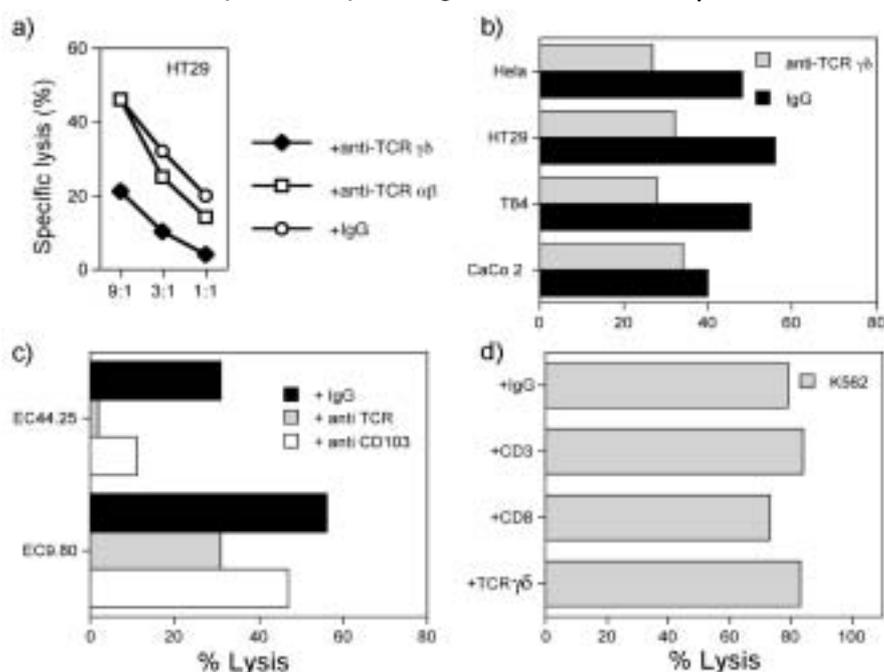
**Figura 4.7:** Citotoxicidad de los clones  $\gamma\delta$  contra dianas de distinto origen, incluyendo células epiteliales y hematopoyéticas. Los resultados muestran el porcentaje de lisis de células marcadas con  $^{51}\text{Cr}$  mediado por tres clones  $\gamma\delta$  representativos: un clon V $\delta$ 1 EC con reactividad epitelial (EC9.80), un V $\delta$ 1 EC no-reactivo (EC9.65) y un clon no reactivo NEC V $\delta$ 2 (NEC40.25). En los paneles a), b) y c) se muestra la reactividad sobre distintos tipos celulares. (a) Células epiteliales de colon HT29, T84 y Caco2; células de epitelio tiroideo HT93; B-LCL CEB21 y K562. (b) Células HeLA y células primarias de enterocitos y células foliculares tiroideas, con las células K562 como control. (c) Células Daudi, HeLa y K562. Todos los clones mostraron actividad NK y fueron negativos contra las Daudi y diversas B-LCL. El clon V $\delta$ 2 NEC40.25 mostró cierta reactividad frente a Daudi, en comparación con otros clones. Todos los clones fueron negativos frente a las células epiteliales primarias de intestino (enterocitos) mientras que se observó reactividad baja frente a las células foliculares del tiroides.

$\gamma\delta$ clone	TCR V $\delta$	Lisis diana	Bloqueo (%)	Perfo- rina	CD 178	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-10	IL-5	IL-4	IL-2	CXC R3	CC R5	CXC R4
9.3	1	+++												
9.72	1	+++	15-30			+	+	-	-	-	-	+	-	+
9.5	1	+++	30-40											
9.80	1	+++	40-50	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
9.59	1	+	25-45		-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
9.58	1	+				+	+	-	-	-	-	+	-	+
9.65	1	-	na	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
9.67	1	-	na		-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
9.90	1	-	na		-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
9.26	2	+	0-20		-	+								
9.57	2	+	nd		-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
9.18	3	+	40-50		-	+		-	-	-				
9.63	3	+	15-30	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
9.44	3	-	na		-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
9.12	5	-	na		-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
9.70	7	+++	0-20		-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
40.22	1	+	0-20		-	+		-						
40.25	2	-	na	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
44.25	na	+++	80	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+

**Tabla 4.3.** Resumen del fenotipo funcional de clones T  $\gamma\delta$  de mucosa intestinal. En la segunda columna, los clones están clasificado según su reactividad: negativa (-), intermedia (+) o alta (+++) contra células epiteliales. En blanco = no determinado. na = no aplicable.

#### 4.6 El reconocimiento de células epiteliales por las células $\gamma\delta$ está mediado por el TCR

La participación del TCR en el reconocimiento de las líneas epiteliales, fue abordado mediante ensayos de inhibición de la citotoxicidad con AcMo anti TCR  $\gamma\delta$ . Los resultados mostraron que la especificidad epitelial de los clones V $\delta$  1 y V $\delta$  3 estaba mediada por el TCR, y que esta reactividad es independiente de la actividad de tipo NK. La lisis de las células epiteliales intestinales fue inhibida hasta un 50% por el AcMo anti TCR  $\gamma\delta$  (**tabla 4.3**). El reconocimiento de la línea HeLa también estuvo mediado por el TCR en los clones V $\delta$ 1 y V $\delta$ 3. Sin embargo, la lisis de la línea intestinal CaCo2 mostró resultados diferenciados de las otras dianas intestinales, ya que en la mayoría de los casos, la lisis de CaCo2 se inhibía menos de un 20% con el anticuerpo anti-TCR $\gamma\delta$ . Los clones V $\delta$ 7 (EC9.70), V $\delta$ 2 (EC9.26) y en clon no celíaco V $\delta$ 1 (NEC40.22) parecían utilizar otro receptor de superficie en el reconocimiento de las células epiteliales, ya que la inhibición siempre fue menor del 20%. El AcMo anti-TCR  $\gamma\delta$  en ningún caso afectó la lisis de las células K562 por estos clones (**figura 4.8**). La molécula CD103, que se expresa en todos los clones y está involucrada en la lisis de células epiteliales por el IEL CD8<sup>+</sup> NEC44.25 (ver capítulo 1), no interviene en la función efectora de estas células, ya que el anticuerpo específico anti-CD103 no inhibía la lisis de dianas epiteliales por ninguno de los clones  $\gamma\delta$ .



**Figura 4.8:** Participación del TCR en el reconocimiento de células epiteliales por IELs  $\gamma\delta$ . Se muestran experimentos representativos de inhibición de la citotoxicidad de dianas epiteliales por el clon EC9.80, usando diversos AcMo. (a) El reconocimiento de la línea HT29 se bloquea con AcMo anti-TCR  $\gamma\delta$  (IMMU-510) y no con un AcMo anti-TCR  $\alpha\beta$  (BMA031); (b) inhibición por anti-TCR  $\gamma\delta$  de la lisis de diferentes líneas epiteliales; no se observó inhibición de la citotoxicidad cuando se usó la línea CaCo2 como diana; (c) el AcMo anti-CD103 no inhibe la lisis de células epiteliales por el clon EC9.80, mientras que sí lo hacen sobre la lisis de mediada por el clon CD8<sup>+</sup> NEC44.25; (d) los AcMo anti CD3, TCR  $\gamma\delta$  o CD8 no produjeron ningún efecto en la actividad NK sobre la línea K562.

## 4.7 Ningún elemento de restricción conocido está asociado al reconocimiento de las células epiteliales por los linfocitos T $\gamma\delta$

### 4.7.1 Los ligandos del TCR para los clones T V $\delta$ 1 y V $\delta$ 3 son distintos a HLA clase-I, CD1 o MIC

Todas las células epiteliales utilizadas en este trabajo expresan en su superficie moléculas de HLA-clase I. Las moléculas de HLA-clase II sólo se expresan en las células HT29 tras la activación por IFN- $\gamma$  (ver figura 1.12,) (202,248). La falta de inhibición observada con AcMo contra epítomos monomórficos de HLA-clase I (W6/32) y HLA-DR (L243) (**figura 4.9a**) indicaron que el reconocimiento de las células epiteliales por las células T  $\gamma\delta$  no está restringido por moléculas clásicas de HLA. Las moléculas no clásicas de HLA, como HLA-G y HLA-E, reconocidas por el AcMo W6/32, también quedaron descartadas.

Las moléculas no clásicas de tipo clase I, CD1 (codificadas fuera del MHC), expresadas por algunas células epiteliales (249), también se consideraron como posibles ligandos de las células T  $\gamma\delta$ . Sin embargo, ninguna de las células epiteliales usadas en este estudio expresaban ninguno de los isotipos de CD1 en la superficie celular o a nivel de mRNA (ver figura 1.13). Por otra parte, AcMo anti CD1c y anti-CD1d, no modificaron el reconocimiento de las células epiteliales mediado por las células T  $\gamma\delta$  (**figura 4.9a**), lo que claramente indicaba que CD1 tampoco era el ligando epitelial.

Estudios de otros grupos han demostrado la interacción específica entre ciertos TCR V $\delta$ 1 y MIC, una molécula homóloga a HLA clase I que se expresa en situaciones de estrés celular (181, 250). Las células epiteliales HT29, T84 y HeLa expresaron niveles medios de MIC (en comparación con las células transfectadas, ver figura 1.15), mientras que en nuestras condiciones de cultivo, no se detectó MIC en la línea Caco2 ni en enterocitos (**figura 4.9b**).

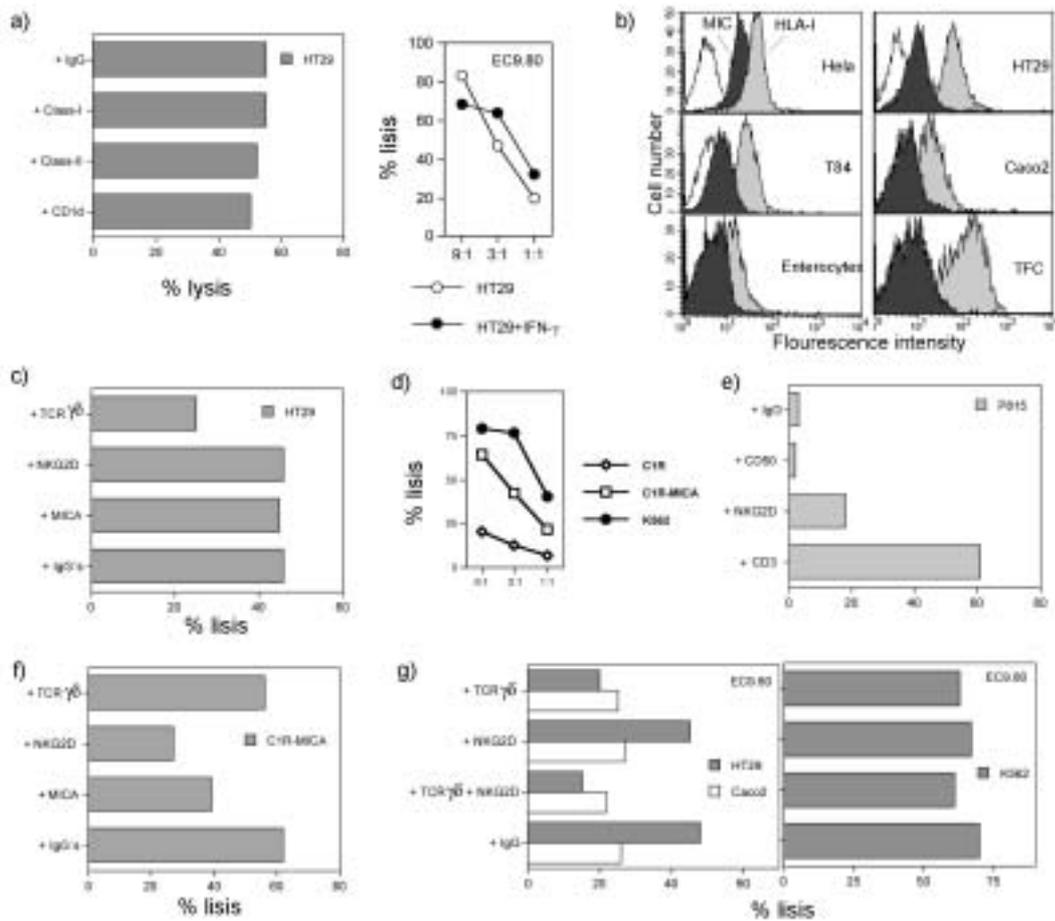
La adición de AcMo anti-MIC (SR116, SR104 y 6D4) a los ensayos de citotoxicidad no modificó la lisis de las líneas epiteliales MIC<sup>+</sup> por los clones V $\delta$ 1 (**figura 4.9c** y datos no mostrados). Esto significa que los TCR V $\delta$ 1 expresados por estos clones  $\gamma\delta$ , no son específicos de MIC.

MIC también funciona como ligando de NKG2D-DAP10, y la interacción entre ambas moléculas aumenta las funciones antígeno específicas de ciertos TCR  $\alpha\beta$  y V $\delta$ 2, en condiciones subóptimas de señalización del TCR (146, 222). La falta de bloqueo en la lisis epitelial con AcMo anti-MIC, también sugería que la interacción de MIC con el receptor NKG2D en las células  $\gamma\delta$  no contribuía a la función efectora mediada por el receptor  $\gamma\delta$ , al menos en nuestras condiciones experimentales. Debe aclararse que la expresión de MIC en las células diana era comparativamente baja y podría ser que no se alcanzara el umbral necesario para inducir la señalización a través de NKG2D (251). De acuerdo con esto, las células  $\gamma\delta$  eran capaces de lisar células C1R transfectadas con MIC (C1R-MICA) con alta eficiencia, lo cual indicaba que si la expresión de MIC era suficiente, podía inducir lisis, posiblemente mediada por la interacción NKG2D/MIC (**figura 4.9d**). En efecto, las moléculas NKG2D expresadas por las células  $\gamma\delta$  eran plenamente funcionales, como se pudo

demostrar en ensayos de lisis redirigida sobre la línea P815 (**figura 4.9e**). La función citotóxica de la interacción NKG2D/MIC en la lisis de las células transfectantes quedó demostrada en ensayos de inhibición por AcMo, ya que tanto el AcMo anti-NKG2D (2D11) como los anticuerpos anti-MIC fueron capaces de inhibir esta lisis (**figura 4.9f**). Por lo tanto, aunque el receptor  $\gamma\delta$  no reconocía MIC, esta molécula podía ser reconocida por la molécula NKG2D expresada por las células  $\gamma\delta$ .

Sin embargo, este NKG2D funcional no intervenía en el reconocimiento del ligando epitelial ni aumentaba la lisis de las dianas MIC<sup>+</sup>. La ausencia de participación de NKG2D en la lisis de las dianas epiteliales se confirmó por la incapacidad del AcMo anti NKG2D de inhibir la lisis (**figura 4.9c**) ni de aumentar la inhibición mediada por el AcMo anti-TCR $\gamma\delta$  (**figura 4.9g**).

En resumen, los datos sugieren que las células  $\gamma\delta$  estaban siendo óptimamente activadas a través de la unión del TCR con su ligando (hasta el momento no definido) y que la interacción MIC/NKG2D no tiene efecto en las células  $\gamma\delta$  si están óptimamente activadas a través de su receptor, como también ocurre en los linfocitos T  $\alpha\beta$ . Es importante notar que los AcMo anti-MIC o anti-NKG2D, tampoco inhibieron la lisis de dianas epiteliales por clon EC9.70 (V $\delta$ 7), no mediada por el TCR. Sin embargo, no sabemos qué ocurre *in vivo* en la enfermedad celíaca, donde la expresión de MIC por las células epiteliales está considerablemente aumentada (168).



**Figura 4.9:** Ausencia de restricción en el reconocimiento de células epiteliales por IELs  $\gamma\delta$ . El ligando del TCR en los clones IEL  $\gamma\delta$  es diferente de HLA-clase I, CD1 o MIC.

(a) La ausencia de inhibición en la lisis de las células HT29 por el clon EC9.80, usando AcMo contra epítomos monomórficos de HLA clase I (W6/32), clase II (L243) y CD1d (CD1d51.1.3), indican que el ligando no está restringido a moléculas clásicas de HLA, no clásicas HLA-G y HLA-E, también reconocidos por W6/32, o por moléculas no-clásicas no-HLA CD1d. Confirmando la falta de participación de los ligandos HLA, el tratamiento de las células epiteliales con IFN- $\gamma$  no modificó la lisis mediada por las células  $\gamma\delta$ . (b) Análisis por FACS de la expresión de MIC (6D4, histograma negro) y HLA-clase I (W6/32, gris) en células epiteliales. Todas las células expresan clase I; HT29, Hela y T84 expresaron MIC, mientras Caco2, enterocitos humanos y células foliculares tiroideas fueron negativas para MIC en nuestras condiciones de cultivo. (c) MIC y NKG2D no están directamente involucrados en el reconocimiento de las células epiteliales mediado por el TCR. Los AcMo's anti-MICA (6D4) y NKG2D (1D11) no inhibieron la lisis de HT29, al contrario que el anti-TCR  $\gamma\delta$ . (d) Las células transfectadas C1R-MICA, de alta expresión de MIC, son lisadas por las células  $\gamma\delta$  con alta eficiencia. (e) La capacidad funcional de NKG2D se muestra a través de la lisis redirigida sobre la línea P815 utilizando el AcMo anti-NKG2D (1D11), que tiene menos eficiencia que la lisis redirigida con el AcMo anti-CD3 (OKT3). (f) El reconocimiento de C1R-MICA si se inhibe con AcMo anti NKG2D y MIC, mientras que el TCR no participa en este reconocimiento. (g) El AcMo anti-NKG2D no aumenta la capacidad del AcMo anti-TCR $\gamma\delta$  de inhibir la lisis de células epiteliales y no modifica la lisis negativa de CaCo2 ni la de K562. Todos los experimentos mostrados están hechos con la línea EC9.80.

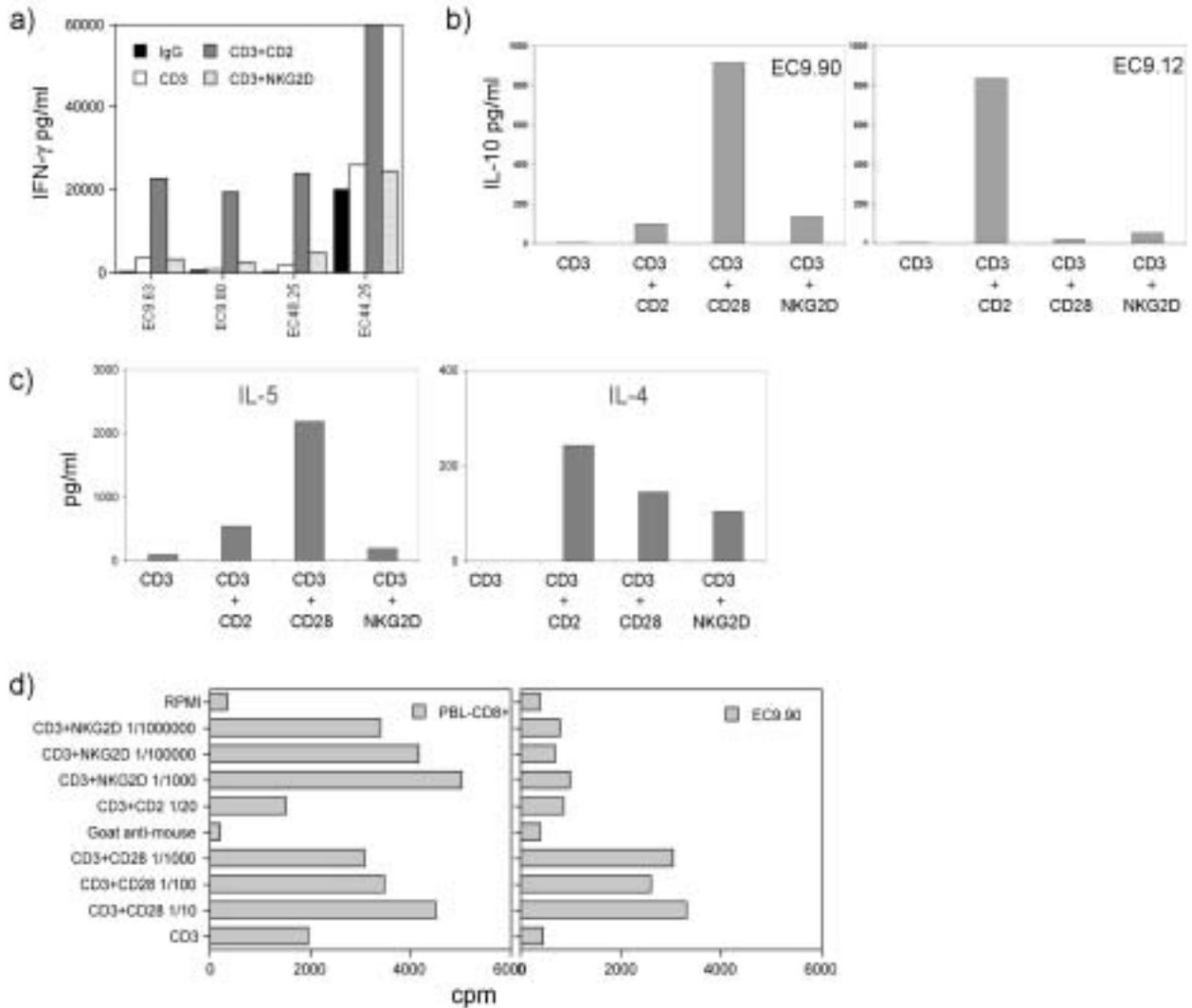
#### 4.8 Coestimulación en las células $\gamma\delta$

La mayoría de las células  $\gamma\delta$  no expresan CD28, pero sí NKG2D, que en ciertas células actúa como molécula coestimuladora (222, 252). Aunque había quedado demostrado que esta molécula no estaba involucrada en el reconocimiento de dianas en la fase efectora de las células  $\gamma\delta$ , investigamos la capacidad de NKG2D de coestimular la producción de citoquinas por las células T  $\gamma\delta$  utilizando clones activados con AcMo anti-CD3 en combinación con anti-NKG2D, anti-CD2 o anti-CD28 en clones positivos.

Se analizaron los clones EC EC9.12, 9.57, 9.58, 9.59, 9.63, 9.65, 9.80 y 9.90, NEC40.25 y clones control CD8<sup>+</sup> TCR  $\alpha\beta$  (EC21.21 y NEC44.25). La **figura 4.10a** muestra el resultado de inducción de la producción de IFN- $\gamma$  por tres clones  $\gamma\delta$  representativos. La incubación con AcMo anti-NKG2D no aumentó la síntesis de IFN- $\gamma$  inducida por el AcMo anti-CD3 en las células  $\gamma\delta$ , en comparación con el AcMo anti-CD2.

Por otra parte, se compararon los niveles de IL-10 liberados por un clon CD28<sup>+</sup> (EC9.90) y un clon CD28<sup>-</sup> (EC9.12), tras la incubación de las células con AcMo anti-CD3, más anti-NKG2D, anti-CD28 o anti-CD2. Tanto la estimulación con anti-CD28, como con anti-CD2, indujeron una producción de IL-10 mayor que anti-NKG2D (**figura 4.10b**). Es interesante notar que el clon EC9.90 incrementó la producción de IL-5 tras la coestimulación con anti-CD28, pero no de IL-4. Por el contrario, la producción de IL-4 sólo aumentaba tras coestimulación con anti-CD2 (**figura 4.10c**). Esto sugiere que diferentes vías coestimuladoras podrían estar involucradas en la inducción de diferentes citoquinas por las células  $\gamma\delta$ .

Además, mientras que tanto el AcMo anti-NKG2D como el anti-CD28 indujeron proliferación de PBL CD8<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$  estimulados con anti-CD3, sólo anti-CD28 fue capaz de inducir la proliferación del clon T  $\gamma\delta$  CD28<sup>+</sup> EC9.90 (**figura 4.10d**). Por lo tanto, mientras que CD28 es plenamente funcional como coestímulo en las células T  $\gamma\delta$  que lo expresan, la capacidad de NKG2D de coestimular estas células es mínima.



**Figura 4.10:** Coestimulación de las células  $\gamma\delta$ . Producción de citoquinas y proliferación de células  $\gamma\delta$  estimuladas en distintas condiciones. (a) Liberación de IFN- $\gamma$  tras la coestimulación inducida a través de anti-CD3 + anti-NKG2D o -CD2. Tres clones  $\gamma\delta$  se compararon con un clon CD8<sup>+</sup> (NEC44.25). Sólo CD2 (204-12) fue capaz de inducir la síntesis de IFN- $\gamma$  en las células estimuladas con AcMo anti-CD3. El anticuerpo anti-NKG2D sólo aumentó la producción a niveles mínimos sobre el basal. (b) CD28 es funcional en las células T  $\gamma\delta$ . La producción de IL-10 se midió por CBA<sup>TM</sup> en dos clones, uno de ellos CD28<sup>+</sup> (EC9.90). El AcMo anti-CD28 (152-2E10) indujo la producción de IL-10 en el clon EC9.90, tan eficientemente como el AcMo anti-CD2 lo hace en el clon EC9.12. CD2 no fue coestimulador en el clon EC9.90. NKG2D no indujo producción de IL-10 de manera eficiente en ninguno de los dos clones. Cada histograma representa la producción de IL-10 en pg/ml. (c) La coestimulación a través de CD28, pero no de CD2 induce liberación de IL-5, mientras que la producción de IL-4 es mayor a través de CD2 (d) Proliferación de PBL CD8<sup>+</sup> luego de la estimulación con OKT3 y distintos coestímulos durante 72 h, comparado con un clon  $\gamma\delta$  CD28<sup>+</sup> (EC9.90). NKG2D fue completamente funcional e indujo la proliferación de los PBL CD8<sup>+</sup>. Sólo el AcMo anti-CD28 produjo un efecto similar en el clon EC9.90. Los resultados se expresan en cpm.



*Discusión IV*

---



En este capítulo se presenta el análisis clonal de células T  $\gamma\delta$  expandidas de una biopsia de mucosa intestinal de un paciente celíaco. Los datos muestran a una población de linfocitos T  $\gamma\delta$  que producen una mezcla heterogénea de citoquinas, que se correlaciona con la capacidad de reconocer y lisar células epiteliales a través de su TCR. Estos resultados también sugieren la existencia de un ligando epitelial reconocido por el TCR expresado por estas células T  $\gamma\delta$ .

La expansión *in vitro* resultó en una población policlonal en la que la mayoría son clones V $\delta$ 1, que como es sabido predominan en la mucosa (170,253). También se aislaron clones T V $\delta$ 3, V $\delta$ 5 y V $\delta$ 7 (171,254). Este reconocimiento de células epiteliales mediado por el TCR, que anteriormente había sido exclusivamente reportado en clones V $\delta$ 1 aislados de cancer colorectal (179), incluye además de V $\delta$ 1, clones V $\delta$ 3. Contrariamente a resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio con un clon T V $\delta$ 5 específico de epitelio tiroideo (204), el clon T V $\delta$ 5 de intestino no reconoció células epiteliales.

A pesar de los datos que muestran baja o nula expresión de CD28 en la mayoría de los linfocitos T  $\gamma\delta$  (124), tres clones V $\delta$ 1 expresaron un CD28 funcional. Son tres clones no reactivos contra epitelio que producen IL-10. Sería interesante investigar si estas células pudieran ser reguladoras potentes en una situación de reconocimiento de antígeno presentado por APC profesionales.

NKG2D es un receptor activador que interacciona con las células epiteliales a través de MICA/B (146) y capaz de coestimular células T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> (222) y linfocitos T V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 (255). NKG2D se expresó en todos nuestros clones  $\gamma\delta$ , pero su rol en estas células parece ser diferente, ya que el AcMo específico de NKG2D no produjo coestimulación. Se sabía que la interacción NKG2D/MIC aumenta la señal Ag específica mediada por el TCR sólo cuando esta ocurre en condiciones sub óptimas (222). Los datos, por lo tanto, indicarían que o bien el TCR  $\gamma\delta$  está óptimamente estimulado por su interacción con su ligando epitelial o que las células T  $\gamma\delta$  usarían otra molécula coestimuladora.

Un aspecto interesante de nuestros datos fue la ausencia de células T  $\gamma\delta$  específicas de MIC. MIC es un ligando de ciertas células  $\gamma\delta$ , que tiene la capacidad de interaccionar tanto con el TCR como con NKG2D (180,181). Sin embargo, las interacciones MIC/NKG2D o MIC/TCR $\gamma\delta$  las pudimos descartar como responsables del reconocimiento de las células epiteliales por las clones T  $\gamma\delta$ . A pesar de la expresión de MIC en las células diana, los AcMo específicos de MIC y NKG2D, no inhibieron el reconocimiento de las células epiteliales. Por lo tanto, en nuestras condiciones experimentales, no aislamos células T  $\gamma\delta$  específicas de MIC. En estudios previos, los clones T  $\gamma\delta$  específicos de MIC fueron obtenidos a partir de estimulaciones con células MIC<sup>+</sup> (180), mientras que nosotros no habíamos determinado la expresión de MIC en el epitelio a partir del cual los clones fueron aislados. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que MIC está altamente expresado en el epitelio intestinal de EC y que el daño en el epitelio está parcialmente mediado por las células CD8<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$  a través de la interacción entre MIC y NKG2D (168,195). Es decir, que la expresión de MIC por las células epiteliales en nuestro cultivo no fué suficiente para inducir la expansión de células T  $\gamma\delta$  MIC específicas o que, alternativamente, la expansión *in vitro* de las células T  $\gamma\delta$  MIC específicas no está favorecida en la EC.

No existen muchos datos sobre el patrón de citoquinas expresado por los IELs  $\gamma\delta$  en la EC. La principal población involucrada en la lesión de la mucosa son las células T  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> específicas de gliadina y productoras de IFN- $\gamma$ , que se encuentran en la lámina propia (17). Los clones  $\gamma\delta$  presentados en este trabajo mostraron un perfil Th1 que parece estar compensado por la expresión de IL-10, IL-4 e IL-5 en clones que carecen de citotoxicidad epitelial. No existen datos sobre clones  $\gamma\delta$  productores de IL-4 en EC. La expresión de IL-5 se demostró en IELs de ratón (256), pero en humanos, el mRNA para IL-5 se detectó en eosinófilos infiltrantes de la mucosa celíaca (91), no en células T  $\gamma\delta$ . Los eosinófilos son abundantes en la mucosa celíaca a donde son reclutados por mecanismos desconocidos. La IL-5, junto con IL-3 y GM-CSF, inducen la atracción y activación de eosinófilos (232). La IL-5 producida por las células T  $\gamma\delta$  podría participar en el reclutamiento de eosinófilos, más que en la regulación de la respuesta Th1. El análisis clonal de citoquinas, en particular algunas como IL-4, difíciles de detectar en cultivos “bulk” debido a su baja expresión y que podrían estar desempeñando un efecto relevante *in situ*, podrían ayudar a clarificar la función de las poblaciones T  $\gamma\delta$  en la regulación de la EC (257).

Los clones también expresaron los receptores de quimiocinas CXCR3 y CCR5 asociados al patrón Th1. CXCR3 es el receptor de 3 quimiocinas proinflamatorias del tipo C-X-C (Mig, IP-10 y TAC) y se expresa en células T  $\gamma\delta$  en timo humano, donde estas tres quimiocinas son producidas por las células epiteliales tímicas (258). Sin embargo, se ha reportado que las quimiocinas CXC no son capaces de activar la quimiotaxis y la migración transendotelial de los linfocitos T  $\gamma\delta$  de sangre periférica (259), por lo tanto la expresión de CXCR3 por todos los linfocitos T  $\gamma\delta$  intestinales podría estar relacionado con la ubicación de los IELs  $\gamma\delta$  en el epitelio intestinal.

Otro receptor asociado a Th1, el CCR5, se expresó en algunos de los IELs  $\gamma\delta$ . CCR5 es el receptor de las quimiocinas MIP1- $\alpha$ , MIP1- $\beta$  y RANTES. Se ha descrito una alta expresión de CCR5 por linfocitos T V $\gamma$ 2V $\delta$ 2, pero no por linfocitos V $\delta$ 1 de sangre periférica (233,266), mientras que los linfocitos T  $\gamma\delta$  de cordón umbilical son CCR5<sup>-</sup> (261).

Un dato interesante surge del análisis de CXCR4. El receptor de SDF, a diferencia de lo que ocurre en IELs CD8<sup>+</sup> TCR  $\alpha\beta$ , se expresó en la mayoría de los clones T  $\gamma\delta$ . La expresión constitutiva de SDF-1 en el epitelio sería de importancia en la atracción de células que recirculan por la mucosa cumpliendo funciones de vigilancia. La presencia de este receptor se ha analizado en el total de la población de IELs, pero no particularmente en los  $\gamma\delta$ . El pequeño porcentaje de IELs CXCR4<sup>+</sup> descrito en otros trabajos, podría corresponder a los IELs  $\gamma\delta$  (152).

Estos datos, junto con el patrón de citoquinas, sugerían un patrón tipo Th1 en las células  $\gamma\delta$  de la mucosa, asociado a un posible patrón regulador en algunos de los clones. En cualquier caso, la expresión de receptores de quimiocinas que definen patrones funcionales en los linfocitos CD4 TCR $\alpha\beta$  convencionales parece no coincidir con los que se expresan en las células  $\gamma\delta$  de la mucosa intestinal.

Según nuestros datos, entre las células  $\gamma\delta$ , unas estarían involucrados en el daño celular reconociendo un ligando epitelial. Qué molécula y de qué manera dirige *in situ* la actividad biológica de las células T  $\gamma\delta$  es todavía un interrogante, aunque se trataría de una molécula relacionada con situaciones de estrés. Otras células T  $\gamma\delta$  presentan un fenotipo diferente, con ausencia de actividad

citotóxica contra líneas epiteliales y síntesis de citoquinas reguladoras como IL-10, IL-4 e IL-5. Estas células T  $\gamma\delta$ , alguna de las cuales expresan CD28, serían responsables de la vigilancia y la reparación del tejido, así como del control de la respuesta de células T autoreactivas influenciando el balance global de citoquinas. La función de las células T  $\gamma\delta$  asociadas al epitelio sería inducida a través del reconocimiento de moléculas que se expresarían preferentemente por el tejido dañado y que actuarían como señal de peligro (“danger signal”).

En resumen, nuestros datos demuestran que los IELs  $\gamma\delta$  expandidos in vitro a partir de una biopsia de un paciente celíaco son heterogéneos. Tienen un perfil citotóxico/Th1, expresan perforina, producen IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  y expresan un perfil de receptores de quimiocinas relacionadas con Th1, con la expresión de CXCR4 como característica que diferenciaría a esta población de los IELs TCR  $\alpha\beta$ . Algunas de las células T  $\gamma\delta$  expandidas protegerían el epitelio o participarían en la regeneración de la mucosa. Hay que tener en cuenta que el número de células T  $\gamma\delta$  en la EC se mantiene elevado incluso después de la recuperación de la mucosa, cuando el papel regulador debe ser esencial (257,262). No sabemos si todos los T  $\gamma\delta$  se mantienen en el epitelio durante la regeneración del tejido, pero podría ser que la distribución de las distintas poblaciones de T  $\gamma\delta$  difieran durante la fase activa y la remisión de la EC.



*Discusión General*

---



El estudio de más de un centenar de clones de linfocitos T intraepiteliales aislados de biopsias de intestino delgado de pacientes celíacos y no celíacos, dibuja una imagen compleja de las poblaciones que constituyen este compartimento del MALT. Tanto en tejido sano como afectado por EC, los IELs son heterogéneos fenotípicamente y funcionalmente. Esta heterogeneidad se refleja en el repertorio de TCR y de moléculas reguladoras de su capacidad funcional así como en el reconocimiento de ligandos epiteliales y en la expresión de citocinas.

Todos los IELs producen IFN- $\gamma$  y la mayoría TNF- $\alpha$ . Entre los IELs CD8<sup>+</sup>, la heterogeneidad de la población residente en la mucosa es tan evidente en ausencia como en presencia de enfermedad celíaca, siendo el patrón de citocinas la diferencia principal entre las dos situaciones. Esto puede ser debido a la expansión de una población minoritaria no reguladora en la enfermedad o a la inducción en la enfermedad de señalización diferencial que modifica el balance final de citocinas. De esta manera, la población de IELs CD8<sup>+</sup> de la mucosa celíaca preferentemente produce IL-2 mientras que en los de mucosa sana expresan mayoritariamente IL-10. El caso de los IELs  $\gamma\delta$  es diferente. La heterogeneidad parece restringida a la población expandida en la enfermedad. Las poblaciones que se observan en EC son diversas sobre todo en la expresión de cadenas  $\delta$  del TCR, reconocimiento de epitelio y perfil de citocinas, sugiriéndose un patrón común de producción de IFN- $\gamma$  que en las células que no reconocen epitelio se asocia a la producción de citocinas reguladoras. Fuera del epitelio, en la lamina propia, hemos observado una población CD8<sup>+</sup> expandida en celiaquía con un receptor monoclonal y capacidad de producción de IL-4.

La heterogeneidad de los linfocitos no sólo se debe al desarrollo de linajes diferenciados por la expresión de marcadores celulares como los correceptores CD4 o CD8, sino que puede ocurrir dentro de un mismo linaje celular (263). Esta heterogeneidad se debe tanto a distintos programas de desarrollo o diferenciación de la célula como al microambiente externo que modula la acción final de la célula T, y que en el caso de la mucosa, es claramente diferente de los tejidos linfoides periféricos.

Los factores que condicionan la respuesta celular van desde la presentación del antígeno hasta los mecanismos propios de regulación de la célula o los generados por células vecinas a través de mediadores solubles o de contacto celular. En estos procesos participan moléculas coestimuladoras, moléculas de adhesión, correceptores y hasta receptores NK (activadores e inhibidores) presentes en células T. Algunos de estos mecanismos regulan la inducción de la respuesta y otros la función efectora.

En nuestros clones observamos la expresión diferencial de marcadores, que podrían ser relevantes en la determinación de la función de la célula T. La expresión de CD28 es un ejemplo. El porcentaje de IELs CD28 positivas es generalmente bajo (15-20%) e *in situ* no se espera que reciban señales a través de esta molécula, ya que los enterocitos no expresan sus coligandos CD80 y CD86. La expresión de CD28 sugiere una interacción previa de la célula con una APC en el NLM o en la misma mucosa. La generación de células con fenotipos funcionales diferentes a partir de una población homogénea se ha demostrado en un modelo de transferencia en que células CD8 con receptores idénticos se diferencian, tras inmunización específica, a células no

citotóxicas en el ganglio y a células citotóxicas en la mucosa, de forma dependiente de la interacción entre CD28 y B7 (264). Por lo tanto, la expresión de CD28 marcaría un subtipo funcional dentro de los clones IELs, quizá más parecido a CTLs efectores específicos de algún antígeno nominal. De hecho, en los clones CD8<sup>+</sup>, esta población es más abundante entre los no reactivos con el epitelio. La expresión de CD28 en los IELs  $\gamma\delta$  se limitó a 3 clones bien definidos, todos  $\delta 1$ , no reactivos frente al epitelio y productores de IL-10. En este caso, podría también tratarse de una población minoritaria con características funcionales diferentes.

Otras moléculas como la integrina  $\alpha_E\beta_7$ , a pesar de expresarse constitutivamente en todos los IELs, tendrían funciones diferentes en distintas poblaciones. La capacidad de bloquear la lisis con AcMo anti CD103 en algunas células CD8<sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$ , se contraponen a la observada con clones  $\gamma\delta$ , en que CD103 no intervenía en la lisis de células epiteliales. Esto indica que los mecanismos de interacción entre las células T y las epiteliales serían diferentes y requerirían de moléculas distintas en ambas poblaciones.

Teniendo en cuenta la heterogeneidad observada en los IELs, cuál de las subpoblaciones definidas tiene mayor relevancia en la mucosa sana y en la que está afectada por la enfermedad celíaca? Obviamente, si existen las diferentes poblaciones, se puede suponer que todas tienen una función en el mantenimiento de la homeostasis en la mucosa. Sin embargo, dada la necesidad de supresión continuada de la respuesta inmune en un tejido permanentemente sometido a contactos con antígenos, la IL-10 debería ser relevante y lo sugiere el hecho que en ausencia de enfermedad, la producción de esta citocina está aumentada en todas las poblaciones CD8<sup>+</sup> que hemos definido. La importancia de esta citocina se confirma en la enfermedad celíaca, en que la subpoblación que reacciona frente al epitelio no es productora de IL-10 pero sí de IL-2. Sin embargo la actividad citotóxica de estas células no está condicionada por la producción de una u otra citocina, ya que la dicotomía no es evidente en las otras subpoblaciones. Nuestros datos sugieren que, aunque haya en el epitelio mucoso células CD8<sup>+</sup> específicas de antígeno o con capacidad citotóxica natural, las que parecen ser más relevante en la EC son las que interactúan con el epitelio. Bien porque la enfermedad induce la expansión de una población minoritaria productora de IL-2 con capacidad presumiblemente de dañar el epitelio, bien porque a consecuencia del proceso inflamatorio, las células CD8<sup>+</sup> modifican su patrón de citocinas, dejando de regular la respuesta inmune *in situ*. Por lo tanto, el dato que relaciona de forma más evidente la función de los IELs CD8<sup>+</sup> con la enfermedad celíaca es el hecho de que la población preferentemente expandida sea productora de IL-2 y no de IL-10. Consecuentemente, la disminución de la capacidad reguladora asociada a la expansión de células productoras de IL-2 contribuiría al desarrollo de la enfermedad en la misma medida que células Tc1 productoras de IL-2 son capaces de hacer una respuesta más eficiente frente a células tumorales (229). Dependiendo del grado de protagonismo de esta desregulación en el proceso patológico, podríamos decir que la susceptibilidad de ciertos individuos a padecer la enfermedad podría asociarse, además de a los factores de riesgo ya conocidos, a alteraciones en la generación, maduración o diferenciación de ciertas células vitales (pe, IELs, T reguladoras, etc) para la correcta homeostasis del sistema.

Las poblaciones de  $\gamma\delta$  no son tan fácilmente relacionables con el proceso patológico ya que su presencia es muy escasa en ausencia de enfermedad. La expansión de todas las subpoblaciones puede, de un modo u otro, estar relacionada con la EC o más bien con su regulación, ya que la expansión de estas células se mantiene aún después de remitir la enfermedad tras la dieta libre de gluten. En nuestras condiciones experimentales, los IELs TCR  $\gamma\delta$  producían IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en menor cantidad que las células CD8<sup>+</sup>TCR  $\alpha\beta$  y no IL-2. Además, las células que no eran capaces de lisar dianas epiteliales, producían citocinas reguladoras como IL-10, IL-4 o IL-5. En uno de estos clones, la producción de IL-5 e IL-10 ocurría vía CD28, mientras que la de IL-4 es vía CD2, sugiriendo que posible vías alternativas de señalización dirigen la célula hacia la producción de una u otra citocina. La mayoría de los IELs  $\gamma\delta$  no expresaban un correceptor asociado, lo que sustentaría la idea de que el reconocimiento no se asocia a elementos de restricción y que la afinidad por el ligando sería suficiente para transmitir la señal. En cualquier caso, la heterogeneidad de las células T  $\gamma\delta$  expandidas en la enfermedad indica una variabilidad de funciones asociadas a la secreción de citoquinas reguladoras y al reconocimiento específico de ligandos epiteliales expresados en condiciones de daño celular.

Ciertas quimiocinas se expresan en la mucosa intestinal en condiciones de inflamación, como MCP-1 (receptor, CCR2) y RANTES (CCR1, CCR3 y CCR5) (151). Sin embargo, la expresión de otras como TECK (receptor, CCR9), SDF-1 (CXCR4), MIP-3 $\alpha$  (CCR6) y MCP-3 (CCR1, CCR2 y CCR3) es constitutiva, algunas restringidas a ciertas zonas del epitelio. Teck se expresa en la cripta pero no en la vellosidad, mientras que MIP-3 $\alpha$  lo hace en la vellosidad (265). Esta expresión diferencial podría implicar la distribución de distintos subtipos de IELs en determinadas zonas del epitelio. Los ligandos de CXCR3, IP-10, I-TAC y MIG no se ha confirmado que se produzcan en el intestino delgado. La expresión abundante de CXCR4 en los IEL  $\gamma\delta$  y algunos CD8<sup>+</sup>, podría relacionarse con el reclutamiento constitutivo de un subgrupo particular de IELs.

Nuestros datos muestran que, aunque la mayor parte de los IELs  $\gamma\delta$  y  $\alpha\beta$  expresan NKG2D, el reconocimiento de las células epiteliales parece ser independiente de este receptor y está restringido por el TCR. Los ligandos de NKG2D, principalmente MIC en humanos y RAE-1 en ratón, interaccionan con dicho receptor induciendo la lisis de las células dianas. Pero qué es lo que determina que, en una célula T, NKG2D participe en la citotoxicidad? Nuestros datos indican que la expresión de NKG2D en clones CD8<sup>+</sup> o  $\gamma\delta$  no es suficiente, ya que se expresa en todas las células, y no es defectivo en células T no reactivas. Esto también ha sido observado en ratón en células T CD8<sup>+</sup> antígeno específicas, en los que NKG2D sólo, es incapaz de inducir producción de citoquinas, flujo de Ca<sup>++</sup> y lisis redirigida (266). No podemos descartar que la falta de actividad citotóxica se deba a una disminución en la expresión del adaptador DAP10 en algunas células. La actividad citotóxica que adquieren muchos clones CD8<sup>+</sup> en cultivos *in vitro* está, al menos en algunos casos, mediada por NKG2D y no por el TCR. En estas células existe una correlación directa entre el nivel de expresión de NKG2D y la lisis, incrementándose ésta con la expresión del adaptador DAP10 (213). No hemos observado diferencias en el nivel de expresión en las células  $\gamma\delta$  y  $\alpha\beta$  que lo expresan. Es más, la expresión de NKG2D no coincide con la capacidad citotóxica

de las células. Por lo tanto, la célula T requeriría de una capacitación previa para inducir la lisis a través de NKG2D.

La presencia de receptores inhibidores (CD94/NKG2A) que regulan negativamente a receptores activadores como NKG2D y/o CD94/NKG2C (243) podrían también justificar la falta de reactividad de algunos clones, aunque no está del todo claro el efecto modulador de los receptores inhibidores en células T. Según Jabri y col, un 23 % de los IELs de biopsias normales expresa CD94, de los cuales un 29% se asocia a NKG2A. En celíacos el número de IELs CD8<sup>+</sup> CD94<sup>+</sup> se incrementa hasta un 70%, de los cuales sólo un 5% son NKG2A<sup>+</sup>. Sólo un 12 % de los T  $\gamma\delta$  es CD94<sup>+</sup>, tanto en EC como en normales (147). En nuestros clones, la expresión de CD94 es exclusiva de los CD8<sup>+</sup> y es independiente de la reactividad citotóxica. De hecho, aunque no hemos determinado qué isoforma de NKG2 se asocia a CD94, los niveles detectados en membrana indicarían una asociación preferente con NKG2C (147). Queda por determinar qué lleva a un linfocito a expresar un determinado receptor inhibidor o activador. Otros receptores NK inhibidores y activadores no se han estudiado en este trabajo, aunque algunos de ellos podrían estar implicados en alguna de las reactividades observadas en los IELs.

Nuestros datos sugieren que, a pesar de la dificultad de identificación de sus ligandos, el principal punto de control de las células T de mucosas es el TCR, incluso en la enfermedad celíaca. Otros receptores pueden intervenir y modular su acción, pero sería central la caracterización de los ligandos epiteliales específicos por las células T del epitelio.

Un resultado que puede ser significativo a la hora de interpretar la acción de las células T en la enfermedad celíaca, es la expansión clonal de células CD8<sup>+</sup>, CD103<sup>-</sup>, V $\alpha$ 2V $\beta$ 8 productoras de IL-4 en la lamina propia, que sugiere el reconocimiento de un ligando no polimórfico expresado en algunas células epiteliales. El segmento TRBJ2S7 dentro de la región V $\beta$ 8, repetido en otras biopsias de EC, sugiere un papel relevante de esta población en la enfermedad, posiblemente a través de la secreción de IL-4. En mucosa se ha descrito una población de células T, llamadas Mucosal Associated Invariant T (MAIT) cells, que utilizan un determinado TCR V $\alpha$  (V $\alpha$ 7.2-J $\alpha$ 33) (159). Son células que se encuentran principalmente en la mucosa y en particular predominan en la LP, si bien su distribución exacta se desconoce, ya que en los estudios realizados se las identifica por la expresión de mRNA para V $\alpha$ 7. Pueden ser células CD4<sup>+</sup>, DN (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) o CD8 $\alpha\alpha$ . Al igual que las NKT, reconocen moléculas de HLA clase 1b asociadas a  $\beta$ 2m e independientes de TAP. A diferencia de las NKT que se seleccionan en el timo y responden a CD1d, las MAIT se seleccionarían y/o reconocerían la molécula MR1, una molécula de tipo HLA de clase I no polimórfica. MR1 se expresa en las células B, razón por la que las MAIT están ausentes en ratones deficientes de linfocitos B, así como en ratones crecidos en condiciones libres de patógenos. Aunque la población que nosotros hemos estudiado es aparentemente específica de la enfermedad, no podemos descartar que se trate de un grupo de células similares a las NKT o las MAIT, sobre todo en lo que se refiere al reconocimiento de un ligando monomórfico. Queda pues la identificación de este ligando.

## Modelo

Qué papel pueden estar ejerciendo todas estas subpoblaciones linfocitarias en una enfermedad en que las principales células efectoras son células CD4 específicas de péptidos de gliadina o relacionados? Si bien es complicado asignar una función a las células estudiadas *in vitro* y asociarlas con el desarrollo de la enfermedad, podemos sugerir algunos modelos.

Estudios básicos de activación y recirculación linfocitaria en ratones, sumados a los estudios fenotípicos realizados *in situ* sugieren que los IELs son poblaciones memoria/efectoras que previamente han sido activadas por un antígeno (105). La activación de los linfocitos vírgenes ocurre en los órganos linfoides secundarios, como los NLM y las PP que se encuentran distribuidos a lo largo de la mucosa intestinal. Algunas poblaciones también serían residentes habituales del tejido, independientemente de si han tenido contacto previo con un antígeno. En ratón estas células serían las CD8 $\alpha\alpha$  y las  $\gamma\delta$ . Algunas de estas células reconocerían ligandos monomórficos y estarían involucradas en la vigilancia, homeostasis y regulación de la respuesta en un sitio donde una de las principales funciones es la de generar tolerancia frente a los antígenos que continuamente están en contacto con la superficie de la mucosa. En humanos, estas dos poblaciones están menos representadas, en favor de un aumento de IELs TCR $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup>, que posiblemente realicen las funciones que se les asigna a las CD8 $\alpha\alpha$  y las T  $\gamma\delta$ .

En condiciones no patológicas algunos IELs, a través de la producción de IL-10 reprimirían procesos inflamatorios que se esperarían en la mucosa. Estas células podrían controlar la capacidad presentadora de células dendríticas de la mucosa, la síntesis de IL-2 y o la síntesis de metaloproteasas, que intervienen en degradación de la matriz extracelular de la lámina propia. Los IELs, a través de la síntesis de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , también podrían participar en los mecanismos de regeneración del epitelio, como se ha sugerido en ratón. Residentes habituales del epitelio, algunos de estos IELs también realizarían funciones de vigilancia reconociendo, a través de su TCR, ligandos epiteliales expresados en condiciones de estrés, como el que sugerimos para NEC44.25.

Qué sucedería en la enfermedad celíaca? En el desarrollo de la enfermedad hay un claro componente inductor que son ciertos péptidos de gliadina. Como se ha comentado en el modelo de la enfermedad descrito en la introducción, algunos péptidos inducirían un incremento en la producción de IL-15 por las células epiteliales, la que incrementaría la capacidad presentadora de células dendríticas presentes en la lámina propia. La respuesta de células T frente a gliadina iniciarían la respuesta inflamatoria mediada por células T CD4 específicas a través de la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , algunas de las cuales también colaborarían en la producción de Acs anti transglutaminasa. Se desconoce de qué manera esta respuesta de células T CD4 se relaciona con el incremento de IELs en el epitelio o de otras células CD8 en la lámina propia. Recientemente se ha propuesto que la IL-15 capacitaría a los IELs para la destrucción del epitelio, a través del reconocimiento de MIC que está claramente incrementado en el epitelio celíaco. Las señales

responsables de este incremento, tampoco se conocen.

Si bien parece evidente una relación NKG2D/MIC en la destrucción del epitelio, nuestros datos apuntan a un relación directa entre el TCR de los IELs y otro ligando epitelial. La interacción NKG2D/MIC, sería, como lo indica el trabajo publicado recientemente por Calliat-Zucman y col (168) más relevante en casos severos de la enfermedad, como lo es la celiaquía refractaria (RCS) en la que hay un aumento de células CD3<sup>+</sup> (NK). Estos autores demuestran que en el reconocimiento de células epiteliales mediado por IELs de enfermos celíacos (no RCS), los Acs anti NKG2D sólo inhiben la citotoxicidad sobre líneas epiteliales en menos de un 5%. Nuestros datos están a favor de esta idea.

Las células candidatas a mediar el daño en el epitelio serían los IELs productores de IL-2, incrementados, según nuestro análisis, en el epitelio celíaco. Este aumento podría ser consecuencia de una disminución de la regulación *in situ* por la ausencia de células productoras de IL-10 o por la desviación de los IELs hacia la producción de IL-2. La secreción de IL-2 contribuiría a la autoproliferación de estos linfocitos previamente activados.

Otros IELs, como los  $\gamma\delta$ , reconocerían ligandos epiteliales distintos a MIC, CD1 y moléculas clásicas de HLA, cuya expresión podría aumentar en inflamación. Estas células también cumplirían funciones de regulación y vigilancia en el epitelio. El hecho de que tras la recuperación de la estructura normal de la mucosa permanezca elevado el número de esta población particular, sustenta un papel en el mantenimiento de la homeostasis en el epitelio y en la regulación de la respuesta. Las células T  $\gamma\delta$  productoras de IL-10 cumplirían funciones en la modulación de la respuesta inflamatoria. Posiblemente sean estas las que predominen en el epitelio normal. La expresión de CXCR4 en la mayoría de estas células sugieren un papel en la vigilancia del epitelio, más que a una respuesta inmune específica de antígeno.

La heterogeneidad observada entre las poblaciones de IELs estaría de acuerdo con que algunos se encuentren diferencialmente distribuidos en las distintas zonas del epitelio (cripta o vellosidad), interaccionando con ligandos específicos expresados en estas zonas.

Cuál es la función de los IELs? Son estas células responsables de vigilar a las células epiteliales y reconocer células tumorales? Cuál es la función del propio epitelio intestinal en el control de la función de los IELs? Cuál es la importancia de la presencia de IELs productores de IL-10? Son cruciales en el desarrollo de la enfermedad? Están contribuyendo al microambiente Th1 asociado a la enfermedad? Son suficientes para influir en el balance general de citoquinas? Están encargados de controlar la presencia de células T autoreactivas? Qué ligandos están reconociendo en las células epiteliales? Cuáles son los mecanismos y qué moléculas son las que regulan la respuesta efectora? Estas son algunas de las preguntas que deben ser respondidas en un futuro. El análisis clonal de un panel importante de IELs podría contribuir a responder algunas de estas incógnitas.

Lo que creo haber comprendido en estos años de Tesis, es lo que Martín Istúriz, profesor e investigador dijo en una de las aulas de la Universidad de Buenos Aires cuando cursaba la carrera de Biología: la Inmunología se puede resumir a un par de círculos que representan una APC y una célula T. Conocer de qué manera se comunican entre ellas ayudará a comprender la fisiología de dos de las principales patologías que alteran el sistema: los tumores y las enfermedades autoinmunes.



*Conclusiones*

---



(I) La caracterización de un IEL CD8<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> demuestra el reconocimiento mediado por el TCR de un ligando, no inducible por IFN- $\gamma$ , expresado en células epiteliales. Las características funcionales del clon y el reordenamiento de la cadena V $\beta$ 5, abundante en la mucosa intestinal, sugiere que este TCR podría reconocer estructuras conservadas en el epitelio, diferentes a los ligandos clásicos de HLA, o no clásicos como MICA, CD1 o HLA-E.

(II) Los IELs CD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> forman una población de gran heterogeneidad funcional en la mucosa intestinal. Hemos demostrado que, en celiaquía, la población preferentemente expandida es productora de IL-2, mientras que IL-10 es dominante en las células de la mucosa sana. La disminución de la capacidad reguladora asociada a la expansión de células productoras de IL-2 podría contribuir al desarrollo de la enfermedad. Por tanto la susceptibilidad a padecer la enfermedad podría asociarse, además de a los factores de riesgo ya conocidos, a alteraciones en el equilibrio entre poblaciones celulares que mantienen la homeostasis del sistema.

(III) La expansión clonal de células CD8<sup>+</sup>, CD103<sup>-</sup>, V $\alpha$ 2V $\beta$ 8 productoras de IL-4 en la lamina propia sugiere el reconocimiento de un ligando monomórfico expresado en algunas células epiteliales. El segmento TRBJ2S7 asociado a la región V $\beta$ 8, repetido en otras biopsias de EC, sugiere un papel relevante de esta población en la enfermedad, probablemente a través de la IL-4.

(IV) En algunas células  $\gamma\delta$  y  $\alpha\beta$  el reconocimiento de las células epiteliales está restringido por el TCR y es independiente de NKG2D. La expresión de NKG2D no se relaciona con la capacidad citotóxica de las células.

(V) La heterogeneidad de las células T  $\gamma\delta$  expandidas en la enfermedad muestra una variabilidad de funciones dentro del epitelio, asociadas a la secreción de citoquinas reguladoras y al reconocimiento específico de ligandos epiteliales expresados en condiciones de daño celular.

(VI) La heterogeneidad dentro de los IELs, observada en las dos principales poblaciones (TCR  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ ), podría ser consecuencia de programas de diferenciación y maduración a los que los IELs se someten durante su desarrollo, condicionados por células, citoquinas y otras moléculas presentes en la mucosa intestinal.





1. Anderson, C.M., A.C. Frazer, J.M. French, C.F. Hawkins, C.A. Ross, and H.G. Sammons. 1954. The influence of gluten and antibacterial agents on fat absorption in the sprue syndrome. *Gastroenterologia* 81:98-103.
2. Paulley, J.W. 1954. Observation on the aetiology of idiopathic steatorrhoea; jejunal and lymph-node biopsies. *Br Med J* 4900:1318-1321.
3. Shiner, M., and I. Doniach. 1960. Histopathologic studies in steatorrhea. *Gastroenterology* 38:419-440.
4. Shiner, M. 1960. Coeliac disease: histopathological findings in the small intestinal mucosa studies by a peroral biopsy technique. *Gut* 1:48-54.
5. Arentz-Hansen, E.H., S.N. McAdam, O. Molberg, C. Kristiansen, and L.M. Sollid. 2000. Production of a panel of recombinant gliadins for the characterisation of T cell reactivity in coeliac disease. *Gut* 46:46-51.
6. Farrell, R.J., and C.P. Kelly. 2002. Celiac sprue. *N Engl J Med* 346:180-188.
7. Maki, M., and P. Collin. 1997. Coeliac disease. *Lancet* 349:1755-1759.
8. Walker-Smith, J.A. 1990. Management of infantile gastroenteritis. *Arch Dis Child* 65:917-918.
9. Marsh, M.N. 1992. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology* 102:330-354.
10. Troncone, R., L. Greco, M. Mayer, F. Paparo, N. Caputo, M. Micillo, P. Mugione, and S. Auricchio. 1996. Latent and potential coeliac disease. *Acta Paediatr Suppl* 412:10-14.
11. Berger, E. 1958. [Allergic pathogenesis of celiac disease with studies of the splitting up of pathogenic antigens by enzymes.]. *Bibl Paediatr* 6:1-55.
12. Peter, J.S., Y. 1996. Autoantibodies. Elsevier.
13. Chorzelski, T.P., J. Sulej, H. Tchorzewska, S. Jablonska, E.H. Beutner, and V. Kumar. 1983. IgA class endomysium antibodies in dermatitis herpetiformis and coeliac disease. *Ann N Y Acad Sci* 420:325-334.
14. Dieterich, W., T. Ehnis, M. Bauer, P. Donner, U. Volta, E.O. Riecken, and D. Schuppan. 1997. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease [see comments]. *Nat Med* 3:797-801.
15. Green, P.H., and B. Jabri. 2003. Coeliac disease. *Lancet* 362:383-391.
16. Sollid, L.M., G. Markussen, J. Ek, H. Gjerde, F. Vartdal, and E. Thorsby. 1989. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J Exp Med* 169:345-350.
17. Sollid, L.M. 2002. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol* 2:647-655.
18. Mayer, L., D. Eisenhardt, P. Salomon, W. Bauer, R. Plous, and L. Piccinini. 1991. Expression of class II molecules on intestinal epithelial cells in humans. Differences between normal and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 100:3-12.
19. Marley, N.J., J.C. Macartney, and P.J. Ciclitira. 1987. HLA-DR, DP and DQ expression in the small intestine of patients with coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 70:386-393.
20. Scott, H., L.M. Sollid, O. Fausa, P. Brandtzaeg, and E. Thorsby. 1987. Expression of major histocompatibility complex class II subregion products by jejunal epithelium in patients with coeliac disease. *Scand J Immunol* 26:563-571.
21. Kelly, J., D.G. Weir, and C. Feighery. 1988. Differential expression of HLA-D gene products in the normal and coeliac small bowel. *Tissue Antigens* 31:151-160.
22. Schweizer, J.J., M.L. Mearin, A.S. Pena, G.J. Offerhaus, E.J. Dreef, B.O. Roep, R.E. Bontrop, L.J. Dooren, C.B. Lamers, and P.J. Hoedemaeker. 1991. Expression of HLA-DQ antigens in the small-intestinal mucosa of patients with coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 26:605-610.
23. Sollid, L.M., and E. Thorsby. 1993. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis [published erratum appears in *Gastroenterology* 1994 Apr;106(4):1133]. *Gastroenterology* 105:910-922.

24. Not, T., K. Horvath, I.D. Hill, J. Partanen, A. Hammed, G. Magazzu, and A. Fasano. 1998. Celiac disease risk in the USA: high prevalence of antiendomysium antibodies in healthy blood donors. *Scand J Gastroenterol* 33:494-498.
25. Gandolfi, L., R. Pratesi, J.C. Cordoba, P.L. Tauil, M. Gasparin, and C. Catassi. 2000. Prevalence of celiac disease among blood donors in Brazil. *Am J Gastroenterol* 95:689-692.
26. Ivarsson, S.A., A. Carlsson, A. Bredberg, J. Alm, S. Aronsson, J. Gustafsson, L. Hagenas, A. Hager, B. Kristrom, C. Marcus, C. Moell, K.O. Nilsson, T. Tuvemo, O. Westphal, K. Albertsson-Wikland, and J. Aman. 1999. Prevalence of coeliac disease in Turner syndrome. *Acta Paediatr* 88:933-936.
27. Riestra, S., E. Fernandez, L. Rodrigo, S. Garcia, and G. Ocio. 2000. Prevalence of Coeliac disease in the general population of northern Spain. Strategies of serologic screening. *Scand J Gastroenterol* 35:398-402.
28. Gomez, J.C., G.S. Selvaggio, M. Viola, B. Pizarro, G. la Motta, S. de Barrio, R. Castelletto, R. Echeverria, E. Sugai, H. Vazquez, E. Maurino, and J.C. Bai. 2001. Prevalence of celiac disease in Argentina: screening of an adult population in the La Plata area. *Am J Gastroenterol* 96:2700-2704.
29. Ferguson, A., and D. Murray. 1971. Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human jejunum. *Gut* 12:988-994.
30. Fry, L., P.P. Seah, R.M. McMinn, and A.V. Hoffbrand. 1972. Lymphocytic infiltration of epithelium in diagnosis of gluten-sensitive enteropathy. *Br Med J* 3:371-374.
31. Selby, W.S., G. Janossy, M. Bofill, and D.P. Jewell. 1983. Lymphocyte subpopulations in the human small intestine. The findings in normal mucosa and in the mucosa of patients with adult coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 52:219-228.
32. Cerf-Bensussan, N., E.E. Schneeberger, and A.K. Bhan. 1983. Immunohistologic and immunoelectron microscopic characterization of the mucosal lymphocytes of human small intestine by the use of monoclonal antibodies. *J Immunol* 130:2615-2622.
33. Cerf-Bensussan, N., A. Jarry, N. Brousse, B. Lisowska-Grosperriere, D. Guy-Grand, and C. Griscelli. 1987. A monoclonal antibody (HML-1) defining a novel membrane molecule present on human intestinal lymphocytes. *Eur J Immunol* 17:1279-1285.
34. Marsh, M.N., R.J. Leigh, D.E. Loft, G.V. Garner, and D.B. Gordon. 1988. Studies of intestinal lymphoid tissue. X-observations on granular epithelial lymphocytes (gEL) in normal and diseased human jejunum. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 412:365-370.
35. Spencer, J., P.G. Isaacson, T.C. Diss, and T.T. MacDonald. 1989. Expression of disulfide-linked and non-disulfide-linked forms of the T cell receptor gamma/delta heterodimer in human intestinal intraepithelial lymphocytes. *Eur J Immunol* 19:1335-1338.
36. Halstensen, T.S., H. Scott, and P. Brandtzaeg. 1989. Intraepithelial T cells of the TcR gamma/delta+ CD8- and V delta 1/J delta 1+ phenotypes are increased in coeliac disease. *Scand J Immunol* 30:665-672.
37. Lundin, K.E., H. Scott, T. Hansen, G. Paulsen, T.S. Halstensen, O. Fausa, E. Thorsby, and L.M. Sollid. 1993. Gliadin-specific, HLA-DQ(alpha 1\*0501,beta 1\*0201) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. *J Exp Med* 178:187-196.
38. Sjostrom, H., K.E. Lundin, O. Molberg, R. Korner, S.N. McAdam, D. Anthonsen, H. Quarsten, O. Noren, P. Roepstorff, E. Thorsby, and L.M. Sollid. 1998. Identification of a gliadin T-cell epitope in coeliac disease: general importance of gliadin deamidation for intestinal T-cell recognition. *Scand J Immunol* 48:111-115.
39. Molberg, O., S.N. McAdam, R. Korner, H. Quarsten, C. Kristiansen, L. Madsen, L. Fugger, H. Scott, O. Noren, P. Roepstorff, K.E. Lundin, H. Sjostrom, and L.M. Sollid. 1998. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease [see comments] [published erratum appears in *Nat Med* 1998 Aug;4(8):974]. *Nat Med* 4:713-717.

40. Newberry, R.D., W.F. Stenson, and R.G. Lorenz. 1999. Cyclooxygenase-2-dependent arachidonic acid metabolites are essential modulators of the intestinal immune response to dietary antigen. *Nat Med* 5:900-906.
41. Arentz-Hansen, H., R. Korner, O. Molberg, H. Quarsten, W. Vader, Y.M. Kooy, K.E. Lundin, F. Koning, P. Roepstorff, L.M. Sollid, and S.N. McAdam. 2000. The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J Exp Med* 191:603-612.
42. Anderson, R.P., P. Degano, A.J. Godkin, D.P. Jewell, and A.V. Hill. 2000. In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. *Nat Med* 6:337-342.
43. Maiuri, L., C. Ciacci, S. Auricchio, V. Brown, S. Quarantino, and M. Londei. 2000. Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology* 119:996-1006.
44. Shan, L., O. Molberg, I. Parrot, F. Hausch, F. Filiz, G.M. Gray, L.M. Sollid, and C. Khosla. 2002. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* 297:2275-2279.
45. Vader, L.W., A. de Ru, Y. van der Wal, Y.M. Kooy, W. Benckhuijsen, M.L. Mearin, J.W. Drijfhout, P. van Veelen, and F. Koning. 2002. Specificity of tissue transglutaminase explains cereal toxicity in celiac disease. *J Exp Med* 195:643-649.
46. Maiuri, L., C. Ciacci, I. Ricciardelli, L. Vacca, V. Raia, S. Auricchio, J. Picard, M. Osman, S. Quarantino, and M. Londei. 2003. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet* 362:30-37.
47. Matzinger, P. 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296:301-305.
48. Zasloff, M. 2002. Trypsin, for the defense. *Nat Immunol* 3:508-510.
49. Madara, J.L. 1997. The chameleon within: improving antigen delivery [comment]. *Science* 277:910-911.
50. Mowat, A.M. 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 3:331-341.
51. Guy-Grand, D., O. Azogui, S. Celli, S. Darche, M.C. Nussenzweig, P. Kourilsky, and P. Vassalli. 2003. Extrathymic T cell lymphopoiesis: ontogeny and contribution to gut intraepithelial lymphocytes in athymic and euthymic mice. *J Exp Med* 197:333-341.
52. Butcher, E.C., and L.J. Picker. 1996. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272:60-66.
53. Arstila, T., T.P. Arstila, S. Calbo, F. Selz, M. Malassis-Seris, P. Vassalli, P. Kourilsky, and D. Guy-Grand. 2000. Identical T cell clones are located within the mouse gut epithelium and lamina propria and circulate in the thoracic duct lymph. *J Exp Med* 191:823-834.
54. Fagarasan, S., and T. Honjo. 2003. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat Rev Immunol* 3:63-72.
55. Pierce, N.F., and J.L. Gowans. 1975. Cellular kinetics of the intestinal immune response to cholera toxoid in rats. *J Exp Med* 142:1550-1563.
56. Rose, N.R., and C. Bona. 1993. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today* 14:426-430.
57. Marrack, P., J. Kappler, and B.L. Kotzin. 2001. Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat Med* 7:899-905.
58. Shevach, E.M. 2000. Regulatory T cells in autoimmunity\*. *Annu Rev Immunol* 18:423-449.
59. Schwartz, M., and J. Kipnis. 2002. Autoimmunity on alert: naturally occurring regulatory CD4(+)CD25(+) T cells as part of the evolutionary compromise between a 'need' and a 'risk'. *Trends Immunol* 23:530-534.
60. Kamradt, T., and N.A. Mitchison. 2001. Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med* 344:655-664.
61. Strobel, S., and A.M. Mowat. 1998. Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunol Today* 19:173-181.

62. Vezys, V., S. Olson, and L. Lefrancois. 2000. Expression of intestine-specific antigen reveals novel pathways of CD8 T cell tolerance induction. *Immunity* 12:505-514.
63. Strober, W., and B. Kelsall. 1998. To be responsive or not to be responsive, that is the mucosal question [editorial; comment]. *Gastroenterology* 114:214-217.
64. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J.E. de Vries, and M.G. Roncarolo. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737-742.
65. Groux, H., and F. Powrie. 1999. Regulatory T cells and inflammatory bowel disease. *Immunity Today* 20:442-445.
66. Chen, Y., V.K. Kuchroo, J. Inobe, D.A. Hafler, and H.L. Weiner. 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265:1237-1240.
67. Shevach, E.M. 2002. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2:389-400.
68. Thornton, A.M., and E.M. Shevach. 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188:287-296.
69. Piccirillo, C.A., J.J. Letterio, A.M. Thornton, R.S. McHugh, M. Mamura, H. Mizuhara, and E.M. Shevach. 2002. CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med* 196:237-246.
70. Nakamura, K., A. Kitani, I. Fuss, A. Pedersen, N. Harada, H. Nawata, and W. Strober. 2004. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol* 172:834-842.
71. Mottet, C., H.H. Uhlig, and F. Powrie. 2003. Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 170:3939-3943.
72. Ke, Y., K. Pearce, J.P. Lake, H.K. Ziegler, and J.A. Kapp. 1997. Gamma delta T lymphocytes regulate the induction and maintenance of oral tolerance. *J Immunol* 158:3610-3618.
73. Banchereau, J., and R.M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
74. Neurath, M.F., S. Finotto, and L.H. Glimcher. 2002. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* 8:567-573.
75. Kuhn, R., J. Lohler, D. Rennick, K. Rajewsky, and W. Muller. 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75:263-274.
76. Romagnani, P., F. Annunziato, M.C. Baccari, and P. Parronchi. 1997. T cells and cytokines in Crohn's disease. *Curr Opin Immunol* 9:793-799.
77. Shanahan, F. 2002. Crohn's disease. *Lancet* 359:62-69.
78. Blumberg, R.S., L.J. Saubermann, and W. Strober. 1999. Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease [published erratum appears in *Curr Opin Immunol* 2000 Apr;12(2):226]. *Curr Opin Immunol* 11:648-656.
79. Fiocchi, C. 1998. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 115:182-205.
80. Forsberg, G., O. Hernell, S. Melgar, A. Israelsson, S. Hammarstrom, and M.L. Hammarstrom. 2002. Paradoxical coexpression of proinflammatory and down-regulatory cytokines in intestinal T cells in childhood celiac disease. *Gastroenterology* 123:667-678.
81. al-Dawoud, A., I. Nakshabendi, A. Foulis, and A.M. Mowat. 1992. Immunohistochemical analysis of mucosal gamma-interferon production in coeliac disease. *Gut* 33:1482-1486.
82. Kontakou, M., R.P. Sturgess, R.T. Przemioslo, G.A. Limb, J.M. Nelufer, and P.J. Ciclitira. 1994. Detection of interferon gamma mRNA in the mucosa of patients with coeliac disease by in situ hybridisation. *Gut* 35:1037-1041.
83. Kontakou, M., R.T. Przemioslo, R.P. Sturgess, G.A. Limb, H.J. Ellis, P. Day, and P.J. Ciclitira. 1995. Cytokine mRNA expression in the mucosa of treated coeliac patients after wheat peptide challenge. *Gut* 37:52-57.

84. Beckett, C.G., D. Dell'Olio, M. Kontakou, R.T. Przemioslo, S. Rosen-Bronson, and P.J. Ciclitira. 1996. Analysis of interleukin-4 and interleukin-10 and their association with the lymphocytic infiltrate in the small intestine of patients with coeliac disease. *Gut* 39:818-823.
85. Westerholm-Ormio, M., J. Garioch, I. Ketola, and E. Savilahti. 2002. Inflammatory cytokines in small intestinal mucosa of patients with potential coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 128:94-101.
86. Nilsen, E.M., F.L. Jahnsen, K.E. Lundin, F.E. Johansen, O. Fausa, L.M. Sollid, J. Jahnsen, H. Scott, and P. Brandtzaeg. 1998. Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. *Gastroenterology* 115:551-563.
87. Lahat, N., S. Shapiro, A. Karban, R. Gerstein, A. Kinarty, and A. Lerner. 1999. Cytokine profile in coeliac disease. *Scand J Immunol* 49:441-446.
88. Nilsen, E.M., K.E. Lundin, P. Krajci, H. Scott, L.M. Sollid, and P. Brandtzaeg. 1995. Gluten specific, HLA-DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon gamma. *Gut* 37:766-776.
89. Troncone, R., C. Gianfrani, G. Mazzarella, L. Greco, J. Guardiola, S. Auricchio, and P. De Berardinis. 1998. Majority of gliadin-specific T-cell clones from celiac small intestinal mucosa produce interferon-gamma and interleukin-4. *Dig Dis Sci* 43:156-161.
90. Salvati, V.M., T.T. MacDonald, M. Bajaj-Elliott, M. Borrelli, A. Staiano, S. Auricchio, R. Troncone, and G. Monteleone. 2002. Interleukin 18 and associated markers of T helper cell type 1 activity in coeliac disease. *Gut* 50:186-190.
91. Desreumaux, P., A. Janin, J.F. Colombel, L. Prin, J. Plumas, D. Emilie, G. Torpier, A. Capron, and M. Capron. 1992. Interleukin 5 messenger RNA expression by eosinophils in the intestinal mucosa of patients with coeliac disease. *J Exp Med* 175:293-296.
92. Salvati, V.M., M. Bajaj-Elliott, R. Poulson, G. Mazzarella, K.E. Lundin, E.M. Nilsen, R. Troncone, and T.T. MacDonald. 2001. Keratinocyte growth factor and coeliac disease. *Gut* 49:176-181.
93. Hansson, T., A.K. Ulfgren, E. Lindroos, A.A. Dann, I. Dahlbom, and L. Klareskog. 2002. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) and tissue transglutaminase expression in the small intestine in children with coeliac disease. *Scand J Immunol* 56:530-537.
94. Mention, J.J., M. Ben Ahmed, B. Begue, U. Barbe, V. Verkarre, V. Asnafi, J.F. Colombel, P.H. Cugnenc, F.M. Ruemmele, E. McIntyre, N. Brousse, C. Cellier, and N. Cerf-Bensussan. 2003. Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology* 125:730-745.
95. Hershberg, R.M., and L.F. Mayer. 2000. Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity. *Immunol Today* 21:123-128.
96. Fehniger, T.A., and M.A. Caligiuri. 2001. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 97:14-32.
97. Roberts, A.I., L. Lee, E. Schwarz, V. Groh, T. Spies, E.C. Ebert, and B. Jabri. 2001. NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment. *J Immunol* 167:5527-5530.
98. Gjertsen, H.A., L.M. Sollid, J. Ek, E. Thorsby, and K.E. Lundin. 1994. T cells from the peripheral blood of coeliac disease patients recognize gluten antigens when presented by HLA-DR, -DQ, or -DP molecules. *Scand J Immunol* 39:567-574.
99. Vader, W., Y. Kooy, P. Van Veelen, A. De Ru, D. Harris, W. Benckhuijsen, S. Pena, L. Mearin, J.W. Drijfhout, and F. Koning. 2002. The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides. *Gastroenterology* 122:1729-1737.
100. Arentz-Hansen, H., S.N. McAdam, O. Molberg, B. Fleckenstein, K.E. Lundin, T.J. Jorgensen, G. Jung, P. Roepstorff, and L.M. Sollid. 2002. Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology* 123:803-809.

101. Qiao, S.W., E. Bergseng, O. Molberg, J. Xia, B. Fleckenstein, C. Khosla, and L.M. Sollid. 2004. Antigen presentation to celiac lesion-derived T cells of a 33-mer gliadin peptide naturally formed by gastrointestinal digestion. *J Immunol* 173:1757-1762.
102. Koning, F., and W. Vader. 2003. Gluten peptides and celiac disease. *Science* 299:513-515; author reply 513-515.
103. Hayday, A., E. Theodoridis, E. Ramsburg, and J. Shires. 2001. Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nat Immunol* 2:997-1003.
104. Ferguson, A. 1977. Intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *Gut* 18:921-937.
105. Lefrancois, L., and D. Masopust. 2002. T cell immunity in lymphoid and non-lymphoid tissues. *Curr Opin Immunol* 14:503-508.
106. Gowans, J.L., G.D. Mc, and D.M. Cowen. 1962. Initiation of immune responses by small lymphocytes. *Nature* 196:651-655.
107. Selby, W.S., G. Janossy, and D.P. Jewell. 1981. Immunohistological characterisation of intraepithelial lymphocytes of the human gastrointestinal tract. *Gut* 22:169-176.
108. Spencer, J., S.B. Dillon, P.G. Isaacson, and T.T. MacDonald. 1986. T cell subclasses in fetal human ileum. *Clin Exp Immunol* 65:553-558.
109. The, T.H., and T.E. Feltkamp. 1970. Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies. I. Experiments on the conditions of conjugation. *Immunology* 18:865-873.
110. Brandtzaeg, P., V. Bosnes, T.S. Halstensen, H. Scott, L.M. Sollid, and K.N. Valnes. 1989. T lymphocytes in human gut epithelium preferentially express the alpha/beta antigen receptor and are often CD45/UCHL1-positive. *Scand J Immunol* 30:123-128.
111. Hedrick, S.M., E.A. Nielsen, J. Kavaler, D.I. Cohen, and M.M. Davis. 1984. Sequence relationships between putative T-cell receptor polypeptides and immunoglobulins. *Nature* 308:153-158.
112. Hedrick, S.M., D.I. Cohen, E.A. Nielsen, and M.M. Davis. 1984. Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. *Nature* 308:149-153.
113. Yanagi, Y., Y. Yoshikai, K. Leggett, S.P. Clark, I. Aleksander, and T.W. Mak. 1984. A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains. *Nature* 308:145-149.
114. Chien, Y., D.M. Becker, T. Lindsten, M. Okamura, D.I. Cohen, and M.M. Davis. 1984. A third type of murine T-cell receptor gene. *Nature* 312:31-35.
115. Saito, H., D.M. Kranz, Y. Takagaki, A.C. Hayday, H.N. Eisen, and S. Tonegawa. 1984. A third rearranged and expressed gene in a clone of cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 312:36-40.
116. Dembic, Z., W. Haas, S. Weiss, J. McCubrey, H. Kiefer, H. von Boehmer, and M. Steinmetz. 1986. Transfer of specificity by murine alpha and beta T-cell receptor genes. *Nature* 320:232-238.
117. Viney, J., T.T. MacDonald, and J. Spencer. 1990. Gamma/delta T cells in the gut epithelium. *Gut* 31:841-844.
118. Spencer, J., and P.G. Isaacson. 1989. Human T-cell receptor expression. *Nature* 337:416.
119. Morita, C.T., R.A. Mariuzza, and M.B. Brenner. 2000. Antigen recognition by human gamma delta T cells: pattern recognition by the adaptive immune system. *Springer Semin Immunopathol* 22:191-217.
120. Cantrell, D.A. 2003. Regulation and function of serine kinase networks in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 15:294-298.
121. Janssen, E., and W. Zhang. 2003. Adaptor proteins in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* 15:269-276.
122. Jarry, A., N. Cerf-Bensussan, N. Brousse, F. Selz, and D. Guy-Grand. 1990. Subsets of CD3+ (T cell receptor alpha/beta or gamma/delta) and CD3- lymphocytes isolated from normal human gut epithelium display phenotypical features different from their counterparts in peripheral blood. *Eur J Immunol* 20:1097-1103.

123. Lundqvist, C., V. Baranov, S. Hammarstrom, L. Athlin, and M.L. Hammarstrom. 1995. Intra-epithelial lymphocytes. Evidence for regional specialization and extrathymic T cell maturation in the human gut epithelium. *Int Immunol* 7:1473-1487.
124. Groh, V., S. Porcelli, M. Fabbi, L.L. Lanier, L.J. Picker, T. Anderson, R.A. Warnke, A.K. Bhan, J.L. Strominger, and M.B. Brenner. 1989. Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J Exp Med* 169:1277-1294.
125. Van Der Merwe, P.A., and S.J. Davis. 2003. Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. *Annu Rev Immunol* 21:659-684.
126. van der Merwe, P.A. 2002. Do T cell receptors do it alone? *Nat Immunol* 3:1122-1123.
127. Das, G., and C.A. Janeway. 2003. MHC specificity of iIELs. *Trends Immunol* 24:88-93.
128. Wang, J.H., and M.J. Eck. 2003. Assembling atomic resolution views of the immunological synapse. *Curr Opin Immunol* 15:286-293.
129. Cepek, K.L., S.K. Shaw, C.M. Parker, G.J. Russell, J.S. Morrow, D.L. Rimm, and M.B. Brenner. 1994. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin. *Nature* 372:190-193.
130. Taraszka, K.S., J.M. Higgins, K. Tan, D.A. Mandelbrot, J.H. Wang, and M.B. Brenner. 2000. Molecular basis for leukocyte integrin alpha(E)beta(7) adhesion to epithelial (E)-cadherin. *J Exp Med* 191:1555-1567.
131. Schon, M.P., A. Arya, E.A. Murphy, C.M. Adams, U.G. Strauch, W.W. Agace, J. Marsal, J.P. Donohue, H. Her, D.R. Beier, S. Olson, L. Lefrancois, M.B. Brenner, M.J. Grusby, and C.M. Parker. 1999. Mucosal T lymphocyte numbers are selectively reduced in integrin alpha E (CD103)-deficient mice. *J Immunol* 162:6641-6649.
132. Wagner, N., J. Lohler, E.J. Kunkel, K. Ley, E. Leung, G. Krissansen, K. Rajewsky, and W. Muller. 1996. Critical role for beta7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue. *Nature* 382:366-370.
133. Shaw, S.K., and M.B. Brenner. 1995. The beta 7 integrins in mucosal homing and retention. *Semin Immunol* 7:335-342.
134. Farstad, I.N., T.S. Halstensen, B. Lien, P.J. Kilshaw, A.I. Lazarovits, P. Brandtzaeg, and A.I. Lazarovitz. 1996. Distribution of beta 7 integrins in human intestinal mucosa and organized gut-associated lymphoid tissue [published erratum appears in *Immunology* 1997 Jun;91(2):322]. *Immunology* 89:227-237.
135. Sillett, H.K., J. Southgate, P.D. Howdle, and L.K. Trejdosiewicz. 1999. Expression of activation and costimulatory elements by human intestinal intraepithelial lymphocytes. *Scand J Immunol* 50:52-60.
136. Panes, J., and D.N. Granger. 1998. Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology* 114:1066-1090.
137. Guy-Grand, D., and P. Vassalli. 2002. Gut intraepithelial lymphocyte development. *Curr Opin Immunol* 14:255-259.
138. Ebert, E.C., and A.I. Roberts. 1996. Human intestinal intraepithelial lymphocytes bind to mucosal mesenchymal cells through VLA4 and CD11A. *Cell Immunol* 167:108-114.
139. A. Benmerah, N.P., Nadine Cerf-Bensussan. 1996. *Essentials of Mucosal Immunology*. Academic Press, Inc, San Diego, CA. 597 pp.
140. Kelleher, D., A. Murphy, S. Lynch, and C. O'Farrelly. 1994. Adhesion molecules utilized in binding of intraepithelial lymphocytes to human enterocytes. *Eur J Immunol* 24:1013-1016.
141. Ebert, E.C. 1990. Intra-epithelial lymphocytes: interferon-gamma production and suppressor/cytotoxic activities. *Clin Exp Immunol* 82:81-85.
142. Ebert, E.C., and A.I. Roberts. 1996. Costimulation of the CD3 pathway by CD28 ligation in human intestinal lymphocytes. *Cell Immunol* 171:211-216.
143. Lenschow, D.J., T.L. Walunas, and J.A. Bluestone. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14:233-258.

144. Lanier, L.L. 2001. On guard—activating NK cell receptors. *Nat Immunol* 2:23-27.
145. Halstensen, T.S., and P. Brandtzaeg. 1993. Activated T lymphocytes in the celiac lesion: non-proliferative activation (CD25) of CD4+ alpha/beta cells in the lamina propria but proliferation (Ki-67) of alpha/beta and gamma/delta cells in the epithelium. *Eur J Immunol* 23:505-510.
146. Bauer, S., V. Groh, J. Wu, A. Steinle, J.H. Phillips, L.L. Lanier, and T. Spies. 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA [see comments]. *Science* 285:727-729.
147. Jabri, B., N.P. de Serre, C. Cellier, K. Evans, C. Gache, C. Carvalho, J.F. Mougnot, M. Allez, R. Jian, P. Desreumaux, J.F. Colombel, C. Matuchansky, H. Cugnenc, M. Lopez-Botet, E. Vivier, A. Moretta, A.I. Roberts, E.C. Ebert, D. Guy-Grand, N. Brousse, J. Schmitz, and N. Cerf-Bensussan. 2000. Selective expansion of intraepithelial lymphocytes expressing the HLA-E-specific natural killer receptor CD94 in celiac disease. *Gastroenterology* 118:867-879.
148. Halstensen, T.S., I.N. Farstad, H. Scott, O. Fausa, and P. Brandtzaeg. 1990. Intraepithelial TcR alpha/beta+ lymphocytes express CD45RO more often than the TcR gamma/delta+ counterparts in coeliac disease. *Immunology* 71:460-466.
149. Ebert, E.C. 1993. Do the CD45RO+CD8+ intestinal intraepithelial T lymphocytes have the characteristics of memory cells? *Cell Immunol* 147:331-340.
150. Kunkel, E.J., J.J. Campbell, G. Haraldsen, J. Pan, J. Boisvert, A.I. Roberts, E.C. Ebert, M.A. Vierra, S.B. Goodman, M.C. Genovese, A.J. Wardlaw, H.B. Greenberg, C.M. Parker, E.C. Butcher, D.P. Andrew, and W.W. Agace. 2000. Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *J Exp Med* 192:761-768.
151. Agace, W.W., A.I. Roberts, L. Wu, C. Greineder, E.C. Ebert, and C.M. Parker. 2000. Human intestinal lamina propria and intraepithelial lymphocytes express receptors specific for chemokines induced by inflammation. *Eur J Immunol* 30:819-826.
152. Agace, W.W., A. Amara, A.I. Roberts, J.L. Pablos, S. Thelen, M. Uguccioni, X.Y. Li, J. Marsal, F. Arenzana-Seisdedos, T. Delaunay, E.C. Ebert, B. Moser, and C.M. Parker. 2000. Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation. *Curr Biol* 10:325-328.
153. Lanier, L.L. 2003. Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 15:308-314.
154. Lundqvist, C., S. Melgar, M.M. Yeung, S. Hammarstrom, and M.L. Hammarstrom. 1996. Intraepithelial lymphocytes in human gut have lytic potential and a cytokine profile that suggest T helper 1 and cytotoxic functions. *J Immunol* 157:1926-1934.
155. Ebert, E.C., and A.I. Roberts. 1996. IL-4 down-regulates the responsiveness of human intraepithelial lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 105:556-560.
156. Carol, M., A. Lambrechts, A. Van Gossum, M. Libin, M. Goldman, and F. Mascart-Lemone. 1998. Spontaneous secretion of interferon gamma and interleukin 4 by human intraepithelial and lamina propria gut lymphocytes. *Gut* 42:643-649.
157. Ebert, E.C. 1998. Tumour necrosis factor-alpha enhances intraepithelial lymphocyte proliferation and migration. *Gut* 42:650-655.
158. O'Shea, J.J., A. Ma, and P. Lipsky. 2002. Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2:37-45.
159. Treiner, E., L. Duban, S. Bahram, M. Radosavljevic, V. Wanner, F. Tilloy, P. Affaticati, S. Gilfillan, and O. Lantz. 2003. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature* 422:164-169.
160. Tilloy, F., E. Treiner, S.H. Park, C. Garcia, F. Lemonnier, H. de la Salle, A. Bendelac, M. Bonneville, and O. Lantz. 1999. An invariant T cell receptor alpha chain defines a novel TAP-independent major histocompatibility complex class Ib-restricted alpha/beta T cell subpopulation in mammals. *J Exp Med* 189:1907-1921.

161. Balk, S.P., E.C. Ebert, R.L. Blumenthal, F.V. McDermott, K.W. Wucherpfennig, S.B. Landau, and R.S. Blumberg. 1991. Oligoclonal expansion and CD1 recognition by human intestinal intraepithelial lymphocytes. *Science* 253:1411-1415.
162. Van Kerckhove, C., G.J. Russell, K. Deusch, K. Reich, A.K. Bhan, H. DerSimonian, and M.B. Brenner. 1992. Oligoclonality of human intestinal intraepithelial T cells. *J Exp Med* 175:57-63.
163. Blumberg, R.S., C.E. Yockey, G.G. Gross, E.C. Ebert, and S.P. Balk. 1993. Human intestinal intraepithelial lymphocytes are derived from a limited number of T cell clones that utilize multiple V beta T cell receptor genes. *J Immunol* 150:5144-5153.
164. Prisco, A., R. Troncone, G. Mazzearella, C. Gianfrani, S. Auricchio, J. Even, C. Tiberio, J. Guardiola, and P. De Berardinis. 1997. Identical T-cell receptor beta chain rearrangements are present in T cells infiltrating the jejunal mucosa of untreated celiac patients. *Hum Immunol* 55:22-33.
165. Gross, G.G., V.L. Schwartz, C. Stevens, E.C. Ebert, R.S. Blumberg, and S.P. Balk. 1994. Distribution of dominant T cell receptor beta chains in human intestinal mucosa. *J Exp Med* 180:1337-1344.
166. Blumberg, R.S., C. Terhorst, P. Bleicher, F.V. McDermott, C.H. Allan, S.B. Landau, J.S. Trier, and S.P. Balk. 1991. Expression of a nonpolymorphic MHC class I-like molecule, CD1D, by human intestinal epithelial cells. *J Immunol* 147:2518-2524.
167. Taunk, J., A.I. Roberts, and E.C. Ebert. 1992. Spontaneous cytotoxicity of human intraepithelial lymphocytes against epithelial cell tumors. *Gastroenterology* 102:69-75.
168. Hue, S., J.J. Mention, R.C. Monteiro, S. Zhang, C. Cellier, J. Schmitz, V. Verkarre, N. Fodil, S. Bahram, N. Cerf-Bensussan, and S. Caillat-Zucman. 2004. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity* 21:367-377.
169. Borst, J., A. Wicherink, J.J. Van Dongen, E. De Vries, W.M. Comans-Bitter, F. Wassenaar, and P. Van Den Elsen. 1989. Non-random expression of T cell receptor gamma and delta variable gene segments in functional T lymphocyte clones from human peripheral blood. *Eur J Immunol* 19:1559-1568.
170. De Libero, G., M.P. Rocci, G. Casorati, C. Giachino, G. Oderda, K. Tavassoli, and N. Migone. 1993. T cell receptor heterogeneity in gamma delta T cell clones from intestinal biopsies of patients with celiac disease. *Eur J Immunol* 23:499-504.
171. Bucht, A., K. Soderstrom, S. Esin, J. Grunewald, S. Hagelberg, I. Magnusson, H. Wigzell, A. Gronberg, and R. Kiessling. 1995. Analysis of gamma delta V region usage in normal and diseased human intestinal biopsies and peripheral blood by polymerase chain reaction (PCR) and flow cytometry. *Clin Exp Immunol* 99:57-64.
172. Haregewoin, A., G. Soman, R.C. Hom, and R.W. Finberg. 1989. Human gamma delta+ T cells respond to mycobacterial heat-shock protein [see comments]. *Nature* 340:309-312.
173. Constant, P., F. Davodeau, M.A. Peyrat, Y. Poquet, G. Puzo, M. Bonneville, and J.J. Fournie. 1994. Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* 264:267-270.
174. Tanaka, Y., C.T. Morita, E. Nieves, M.B. Brenner, and B.R. Bloom. 1995. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature* 375:155-158.
175. Tanaka, Y., S. Sano, E. Nieves, G. De Libero, D. Rosa, R.L. Modlin, M.B. Brenner, B.R. Bloom, and C.T. Morita. 1994. Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8175-8179.
176. Bukowski, J.F., C.T. Morita, and M.B. Brenner. 1999. Human gamma delta T cells recognize alkylamines derived from microbes, edible plants, and tea: implications for innate immunity. *Immunity* 11:57-65.
177. Gober, H.J., M. Kistowska, L. Angman, P. Jenö, L. Mori, and G. De Libero. 2003. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med* 197:163-168.

178. Spada, F.M., E.P. Grant, P.J. Peters, M. Sugita, A. Melian, D.S. Leslie, H.K. Lee, E. van Donselaar, D.A. Hanson, A.M. Krensky, O. Majdic, S.A. Porcelli, C.T. Morita, and M.B. Brenner. 2000. Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. *J Exp Med* 191:937-948.
179. Maeurer, M.J., D. Martin, W. Walter, K. Liu, L. Zitvogel, K. Halusczyk, H. Rabinowich, R. Duquesnoy, W. Storkus, and M.T. Lotze. 1996. Human intestinal Vdelta1+ lymphocytes recognize tumor cells of epithelial origin. *J Exp Med* 183:1681-1696.
180. Groh, V., A. Steinle, S. Bauer, and T. Spies. 1998. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 279:1737-1740.
181. Wu, J., V. Groh, and T. Spies. 2002. T cell antigen receptor engagement and specificity in the recognition of stress-inducible MHC class I-related chains by human epithelial gamma delta T cells. *J Immunol* 169:1236-1240.
182. Girardi, M., D.E. Oppenheim, C.R. Steele, J.M. Lewis, E. Glusac, R. Filler, P. Hobby, B. Sutton, R.E. Tigelaar, and A.C. Hayday. 2001. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 294:605-609.
183. Cosman, D., J. Mullberg, C.L. Sutherland, W. Chin, R. Armitage, W. Fanslow, M. Kubin, and N.J. Chalupny. 2001. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14:123-133.
184. Crowley, M.P., A.M. Fahrner, N. Baumgarth, J. Hampl, I. Gutgemann, L. Teyton, and Y. Chien. 2000. A population of murine gammadelta T cells that recognize an inducible MHC class Ib molecule. *Science* 287:314-316.
185. Bandeira, A., T. Mota-Santos, S. Itohara, S. Degermann, C. Heusser, S. Tonegawa, and A. Coutinho. 1990. Localization of gamma/delta T cells to the intestinal epithelium is independent of normal microbial colonization. *J Exp Med* 172:239-244.
186. Regnault, A., P. Kourilsky, and A. Cumano. 1995. The TCR-beta chain repertoire of gut-derived T lymphocytes. *Semin Immunol* 7:307-319.
187. Rocha, B., P. Vassalli, and D. Guy-Grand. 1994. Thymic and extrathymic origins of gut intraepithelial lymphocyte populations in mice. *J Exp Med* 180:681-686.
188. Rocha, B., H. von Boehmer, and D. Guy-Grand. 1992. Selection of intraepithelial lymphocytes with CD8 alpha/alpha co-receptors by self-antigen in the murine gut. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5336-5340.
189. Leishman, A.J., O.V. Naidenko, A. Attinger, F. Koning, C.J. Lena, Y. Xiong, H.C. Chang, E. Reinherz, M. Kronenberg, and H. Cheroutre. 2001. T cell responses modulated through interaction between CD8alpha/alpha and the nonclassical MHC class I molecule, TL. *Science* 294:1936-1939.
190. Gangadharan, D., and H. Cheroutre. 2004. The CD8 isoform CD8alpha/alpha is not a functional homologue of the TCR co-receptor CD8alpha/beta. *Curr Opin Immunol* 16:264-270.
191. Poussier, P., T. Ning, D. Banerjee, and M. Julius. 2002. A unique subset of self-specific intrainestinal T cells maintains gut integrity. *J Exp Med* 195:1491-1497.
192. Yang, H., P.A. Antony, B.E. Wildhaber, and D.H. Teitelbaum. 2004. Intestinal intraepithelial lymphocyte gammadelta-T cell-derived keratinocyte growth factor modulates epithelial growth in the mouse. *J Immunol* 172:4151-4158.
193. Jameson, J., K. Ugarte, N. Chen, P. Yachi, E. Fuchs, R. Boismenu, and W.L. Havran. 2002. A role for skin gammadelta T cells in wound repair. *Science* 296:747-749.
194. Jameson, J., D. Witherden, and W.L. Havran. 2003. T-cell effector mechanisms: gammadelta and CD1d-restricted subsets. *Curr Opin Immunol* 15:349-353.
195. Meresse, B., Z. Chen, C. Ciszewski, M. Tretiakova, G. Bhagat, T.N. Krausz, D.H. Raulet, L.L. Lanier, V. Groh, T. Spies, E.C. Ebert, P.H. Green, and B. Jabri. 2004. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity* 21:357-366.

196. Meader, R.D., and D.F. Landers. 1967. Electron and light microscopic observations on relationships between lymphocytes and intestinal epithelium. *Am J Anat* 121:763-773.
197. Goodman, T., and L. Lefrancois. 1988. Expression of the gamma-delta T-cell receptor on intestinal CD8+ intraepithelial lymphocytes. *Nature* 333:855-858.
198. Spencer, J., P.G. Isaacson, T.T. MacDonald, A.J. Thomas, and J.A. Walker-Smith. 1991. Gamma/delta T cells and the diagnosis of coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 85:109-113.
199. Maki, M., K. Holm, P. Collin, and E. Savilahti. 1991. Increase in gamma/delta T cell receptor bearing lymphocytes in normal small bowel mucosa in latent coeliac disease. *Gut* 32:1412-1414.
200. Rust, C., Y. Kooy, S. Pena, M.L. Mearin, P. Kluin, and F. Koning. 1992. Phenotypical and functional characterization of small intestinal TcR gamma delta + T cells in coeliac disease. *Scand J Immunol* 35:459-468.
201. Lahat, N., A. Ben-Nun, L. Cohen, A. Kinarty, and A. Lerner. 1995. T cell receptor repertoire in the peripheral blood and intestinal mucosa of coeliac patients. *Clin Exp Immunol* 101:422-427.
202. Kaiserlian, D., D. Rigal, J. Abello, and J.P. Revillard. 1991. Expression, function and regulation of the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on human intestinal epithelial cell lines. *Eur J Immunol* 21:2415-2421.
203. Belfiore, A., T. Mauerhoff, R. Pujol-Borrell, K. Badenhop, M. Buscema, R. Mirakian, and G.F. Bottazzo. 1991. De novo HLA class II and enhanced HLA class I molecule expression in SV40 transfected human thyroid epithelial cells. *J Autoimmun* 4:397-414.
204. Catalfamo, M., C. Roura-Mir, M. Sospedra, P. Aparicio, S. Costagliola, M. Ludgate, R. Pujol-Borrell, and D. Jaraquemada. 1996. Self-reactive cytotoxic gamma delta T lymphocytes in Graves' disease specifically recognize thyroid epithelial cells. *J Immunol* 156:804-811.
205. Haddad, E.K., X. Wu, J.A. Hammer, 3rd, and P.A. Henkart. 2001. Defective granule exocytosis in Rab27a-deficient lymphocytes from Ashen mice. *J Cell Biol* 152:835-842.
206. Chen, R., L. Lowe, J.D. Wilson, E. Crowther, K. Tzeggai, J.E. Bishop, and R. Varro. 1999. Simultaneous Quantification of Six Human Cytokines in a Single Sample Using Microparticle-based Flow Cytometric Technology. *Clin Chem* 45:1693-1694.
207. Olive, C., P.A. Gatenby, and S.W. Serjeantson. 1992. Variable gene usage of T cell receptor gamma- and delta-chain transcripts expressed in synovia and peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 87:172-177.
208. Genevee, C., A. Diu, J. Nierat, A. Caignard, P.Y. Dietrich, L. Ferradini, S. Roman-Roman, F. Triebel, and T. Hercend. 1992. An experimentally validated panel of subfamily-specific oligonucleotide primers (V alpha 1-w29/V beta 1-w24) for the study of human T cell receptor variable V gene segment usage by polymerase chain reaction. *Eur J Immunol* 22:1261-1269.
209. Bragado, R., P. Lauzurica, D. Lopez, and J.A. Lopez de Castro. 1990. T cell receptor V beta gene usage in a human alloreactive response. Shared structural features among HLA-B27-specific T cell clones. *J Exp Med* 171:1189-1204.
210. Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
211. Church, G.M., and W. Gilbert. 1984. Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:1991-1995.
212. Colgan, S.P., V.M. Morales, J.L. Madara, J.E. Polischuk, S.P. Balk, and R.S. Blumberg. 1996. IFN-gamma modulates CD1d surface expression on intestinal epithelia. *Am J Physiol* 271:C276-283.
213. Verneris, M.R., M. Karami, J. Baker, A. Jayaswal, and R.S. Negrin. 2004. Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8+ T cells. *Blood* 103:3065-3072.

214. Roberts, A.I., S.M. O'Connell, L. Biancone, R.E. Brolin, and E.C. Ebert. 1993. Spontaneous cytotoxicity of intestinal intraepithelial lymphocytes: clues to the mechanism [see comments]. *Clin Exp Immunol* 94:527-532.
215. Noda, M., Y. Tatsumi, M. Tomizawa, T. Takama, S. Mitsufuji, H. Sugihara, K. Kashima, and T. Hattori. 2002. Effects of etodolac, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on the expression of E-cadherin-catenin complexes in gastrointestinal cell lines. *J Gastroenterol* 37:896-904.
216. Dogan, A., Z.D. Wang, and J. Spencer. 1995. E-cadherin expression in intestinal epithelium. *J Clin Pathol* 48:143-146.
217. Roberts, A.I., S.M. O'Connell, and E.C. Ebert. 1993. Intestinal intraepithelial lymphocytes bind to colon cancer cells by HML-1 and CD11a. *Cancer Res* 53:1608-1611.
218. Cepek, K.L., C.M. Parker, J.L. Madara, and M.B. Brenner. 1993. Integrin alpha E beta 7 mediates adhesion of T lymphocytes to epithelial cells. *J Immunol* 150:3459-3470.
219. Sarnacki, S., B. Begue, H. Buc, F. Le Deist, and N. Cerf-Bensussan. 1992. Enhancement of CD3-induced activation of human intestinal intraepithelial lymphocytes by stimulation of the beta 7-containing integrin defined by HML-1 monoclonal antibody. *Eur J Immunol* 22:2887-2892.
220. Kilshaw, P.J., and J.M. Higgins. 2002. Alpha E: no more rejection? *J Exp Med* 196:873-875.
221. Woolfson, A., and C. Milstein. 1994. Alternative splicing generates secretory isoforms of human CD1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:6683-6687.
222. Groh, V., R. Rhinehart, J. Randolph-Habecker, M.S. Topp, S.R. Riddell, and T. Spies. 2001. Costimulation of CD8alpha beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2:255-260.
223. Guy-Grand, D., J.P. DiSanto, P. Henchoz, M. Malassis-Seris, and P. Vassalli. 1998. Small bowel enteropathy: role of intraepithelial lymphocytes and of cytokines (IL-12, IFN-gamma, TNF) in the induction of epithelial cell death and renewal. *Eur J Immunol* 28:730-744.
224. Nakazawa, A., M. Watanabe, T. Kanai, T. Yajima, M. Yamazaki, H. Ogata, H. Ishii, M. Azuma, and T. Hibi. 1999. Functional expression of costimulatory molecule CD86 on epithelial cells in the inflamed colonic mucosa [see comments]. *Gastroenterology* 117:536-545.
225. Olausson, R.W., F.E. Johansen, K.E. Lundin, J. Jahnsen, P. Brandtzaeg, and I.N. Farstad. 2002. Interferon-gamma-secreting T cells localize to the epithelium in coeliac disease. *Scand J Immunol* 56:652-664.
226. Mizrachi, A., E. Broide, A. Buchs, A. Kornberg, D. Aharoni, T. Bistrizter, and M.J. Rapoport. 2002. Lack of correlation between disease activity and decreased stimulated secretion of IL-10 in lymphocytes from patients with celiac disease. *Scand J Gastroenterol* 37:924-930.
227. Pestka, S., C.D. Krause, D. Sarkar, M.R. Walter, Y. Shi, and P.B. Fisher. 2004. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 22:929-979.
228. Maiuri, L., C. Ciacci, V. Raia, L. Vacca, I. Ricciardelli, F. Raimondi, S. Auricchio, S. Quarantino, and M. Londei. 2001. FAS engagement drives apoptosis of enterocytes of coeliac patients. *Gut* 48:418-424.
229. Mosmann, T.R., L. Li, and S. Sad. 1997. Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns. *Semin Immunol* 9:87-92.
230. de Waal Malefyt, R., H. Yssel, and J.E. de Vries. 1993. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J Immunol* 150:4754-4765.
231. Zund, G., J.L. Madara, A.L. Dzus, C.S. Awtrey, and S.P. Colgan. 1996. Interleukin-4 and interleukin-13 differentially regulate epithelial chloride secretion. *J Biol Chem* 271:7460-7464.

232. Desreumaux, P., E. Delaporte, J.F. Colombel, M. Capron, A. Cortot, and A. Janin. 1998. Similar IL-5, IL-3, and GM-CSF syntheses by eosinophils in the jejunal mucosa of patients with celiac disease and dermatitis herpetiformis. *Clin Immunol Immunopathol* 88:14-21.
233. Glatzel, A., D. Wesch, F. Schiemann, E. Brandt, O. Janssen, and D. Kabelitz. 2002. Patterns of chemokine receptor expression on peripheral blood gamma delta T lymphocytes: strong expression of CCR5 is a selective feature of V delta 2/V gamma 9 gamma delta T cells. *J Immunol* 168:4920-4929.
234. Bleul, C.C., L. Wu, J.A. Hoxie, T.A. Springer, and C.R. Mackay. 1997. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1925-1930.
235. Wright, N., A. Hidalgo, J.M. Rodriguez-Frade, S.F. Soriano, M. Mellado, M. Parmo-Cabanas, M.J. Briskin, and J. Teixido. 2002. The chemokine stromal cell-derived factor-1 alpha modulates alpha 4 beta 7 integrin-mediated lymphocyte adhesion to mucosal addressin cell adhesion molecule-1 and fibronectin. *J Immunol* 168:5268-5277.
236. Koop, B.F., L. Rowen, K. Wang, C.L. Kuo, D. Seto, J.A. Lenstra, S. Howard, W. Shan, P. Deshpande, and L. Hood. 1994. The human T-cell receptor TCRAC/TCRDC (C alpha/C delta) region: organization, sequence, and evolution of 97.6 kb of DNA. *Genomics* 19:478-493.
237. Siu, G., E.C. Strauss, E. Lai, and L.E. Hood. 1986. Analysis of a human V beta gene subfamily. *J Exp Med* 164:1600-1614.
238. Toyonaga, B., Y. Yoshikai, V. Vadasz, B. Chin, and T.W. Mak. 1985. Organization and sequences of the diversity, joining, and constant region genes of the human T-cell receptor beta chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:8624-8628.
239. Tunnacliffe, A., R. Kefford, C. Milstein, A. Forster, and T.H. Rabbitts. 1985. Sequence and evolution of the human T-cell antigen receptor beta-chain genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:5068-5072.
240. Takahashi, T., M. Nieda, Y. Koezuka, A. Nicol, S.A. Porcelli, Y. Ishikawa, K. Tadokoro, H. Hirai, and T. Juji. 2000. Analysis of human V alpha 24+ CD4+ NKT cells activated by alpha-glycosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 164:4458-4464.
241. Mowat, A.M., and M.B. Widmer. 1995. A role for IL-4 in immunologically mediated enteropathy. *Clin Exp Immunol* 99:65-69.
242. Godfrey, D.I., K.J. Hammond, L.D. Poulton, M.J. Smyth, and A.G. Baxter. 2000. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* 21:573-583.
243. Halary, F., M.A. Peyrat, E. Champagne, M. Lopez-Botet, A. Moretta, L. Moretta, H. Vie, J.J. Fournie, and M. Bonneville. 1997. Control of self-reactive cytotoxic T lymphocytes expressing gamma delta T cell receptors by natural killer inhibitory receptors. *Eur J Immunol* 27:2812-2821.
244. Jabri, B., J.M. Selby, H. Negulescu, L. Lee, A.I. Roberts, A. Beavis, M. Lopez-Botet, E.C. Ebert, and R.J. Winchester. 2002. TCR specificity dictates CD94/NKG2A expression by human CTL. *Immunity* 17:487-499.
245. Tanaka, M., T. Itai, M. Adachi, and S. Nagata. 1998. Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med* 4:31-36.
246. Migone, N., S. Padovan, C. Zappador, C. Giachino, M. Bottaro, G. Matullo, C. Carbonara, G.D. Libero, and G. Casorati. 1995. Restriction of the T-cell receptor V delta gene repertoire is due to preferential rearrangement and is independent of antigen selection. *Immunogenetics* 42:323-332.
247. Marx, S., D. Wesch, and D. Kabelitz. 1997. Activation of human gamma delta T cells by Mycobacterium tuberculosis and Daudi lymphoma cells: differential regulatory effect of IL-10 and IL-12. *J Immunol* 158:2842-2848.

248. Hoang, P., B. Crotty, H.R. Dalton, and D.P. Jewell. 1992. Epithelial cells bearing class II molecules stimulate allogeneic human colonic intraepithelial lymphocytes. *Gut* 33:1089-1093.
249. Balk, S.P., S. Burke, J.E. Polischuk, M.E. Frantz, L. Yang, S. Porcelli, S.P. Colgan, and R.S. Blumberg. 1994. Beta 2-microglobulin-independent MHC class Ib molecule expressed by human intestinal epithelium. *Science* 265:259-262.
250. Groh, V., S. Bahram, S. Bauer, A. Herman, M. Beauchamp, and T. Spies. 1996. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:12445-12450.
251. Salih, H.R., H.G. Rammensee, and A. Steinle. 2002. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol* 169:4098-4102.
252. Billadeau, D.D., J.L. Upshaw, R.A. Schoon, C.J. Dick, and P.J. Leibson. 2003. NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway. *Nat Immunol* 4:557-564.
253. Giachino, C., M.P. Rocci, G. De Libero, G. Oderda, N. Ansaldi, and N. Migone. 1994. An alternative approach to the assessment of gamma delta T-cell clonality in celiac disease intestinal lesions through cDNA heteroduplex analysis of T-cell receptor VJ junctions. *Hum Immunol* 40:303-311.
254. Falk, M.C., G. Ng, G.Y. Zhang, G.C. Fanning, K.R. Kamath, and J.F. Knight. 1994. Predominance of T cell receptor V delta 3 in small bowel biopsies from coeliac disease patients. *Clin Exp Immunol* 98:78-82.
255. Das, H., V. Groh, C. Kuijl, M. Sugita, C.T. Morita, T. Spies, and J.F. Bukowski. 2001. Mica engagement by human vgamma2vdelta2 t cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity* 15:83-93.
256. Taguchi, T., W.K. Aicher, K. Fujihashi, M. Yamamoto, J.R. McGhee, J.A. Bluestone, and H. Kiyono. 1991. Novel function for intestinal intraepithelial lymphocytes. Murine CD3+, gamma/delta TCR+ T cells produce IFN-gamma and IL-5. *J Immunol* 147:3736-3744.
257. Williams, N. 1998. T cells on the mucosal frontline [news; comment]. *Science* 280:198-200.
258. Romagnani, P., F. Annunziato, E. Lazzeri, L. Cosmi, C. Beltrame, L. Lasagni, G. Galli, M. Francalanci, R. Manetti, F. Marra, V. Vanini, E. Maggi, and S. Romagnani. 2001. Interferon-inducible protein 10, monokine induced by interferon gamma, and interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant are produced by thymic epithelial cells and attract T-cell receptor (TCR) alphabeta+ CD8+ single-positive T cells, TCRgammadelta+ T cells, and natural killer-type cells in human thymus. *Blood* 97:601-607.
259. Roth, S.J., T.G. Diacovo, M.B. Brenner, J.P. Rosat, J. Buccola, C.T. Morita, and T.A. Springer. 1998. Transendothelial chemotaxis of human alpha/beta and gamma/delta T lymphocytes to chemokines. *Eur J Immunol* 28:104-113.
260. Cipriani, B., G. Borsellino, F. Poccia, R. Placido, D. Tramonti, S. Bach, L. Battistini, and C.F. Brosnan. 2000. Activation of C-C beta-chemokines in human peripheral blood gammadelta T cells by isopentenyl pyrophosphate and regulation by cytokines. *Blood* 95:39-47.
261. Dagna, L., A. Iellem, P. Biswas, D. Resta, F. Tantardini, C. Fortis, M.G. Sabbadini, D. D'Ambrosio, A.A. Manfredi, and M. Ferrarini. 2002. Skewing of cytotoxic activity and chemokine production, but not of chemokine receptor expression, in human type-1/-2 gamma delta T lymphocytes. *Eur J Immunol* 32:2934-2943.
262. Witherden, D.A., S.E. Rieder, R. Boismenu, and W.L. Havran. 2000. A role for epithelial gamma delta T cells in tissue repair. *Springer Semin Immunopathol* 22:265-281.
263. Woodland, D.L. 2003. Cell-mediated immunity to respiratory virus infections. *Curr Opin Immunol* 15:430-435.
264. Kim, S.K., D.S. Reed, S. Olson, M.J. Schnell, J.K. Rose, P.A. Morton, and L. Lefrancois. 1998. Generation of mucosal cytotoxic T cells against soluble protein by tissue-specific environmental and costimulatory signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10814-10819.

265. Agace, W.W., J.M. Higgins, B. Sadasivan, M.B. Brenner, and C.M. Parker. 2000. T-lymphocyte-epithelial-cell interactions: integrin alpha(E)(CD103)beta(7), LEEP-CAM and chemokines. *Curr Opin Cell Biol* 12:563-568.
266. Jamieson, A.M., A. Diefenbach, C.W. McMahon, N. Xiong, J.R. Carlyle, and D.H. Raulet. 2002. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity* 17:19-29.







*Los siguientes trabajos se están preparando para enviar a publicación:*

***(1) Clonal analysis of  $\gamma\delta$  cell expansion in celiac disease defines heterogeneous subsets and reveals new TCR epithelial ligands***

*Running title:* Human  $\gamma\delta$  T cells in celiac disease

Edgardo C. Kolkowski, Marta Catálfamo, Laia Muxí, David Botello, Adrián Morelli, Sophie Caillat-Zucman, Veronika Groh, Ricardo Pujol-Borrell and Dolores Jaraquemada

***(2) Human intestinal  $CD8^+ \alpha\beta$  IELs in celiac disease: Lower IL-10 synthesis and enhanced IL-2 production.***

*Running Title:* Cytokine profile of celiac IELs clones

Edgardo C. Kolkowski, Marco Fernández, Ricardo Pujol-Borrell and Dolores Jaraquemada.

*Agradecimientos*

---



*Mucha gente para agradecer. Quizá debiera hacer un capítulo y no un apartado final. Pero por razones de tiempo y espacio intentaré ser breve, procurando no olvidarme de nadie. De todos tengo un sinfín de cosas para agradecer. De todos he sacado cosas buenas. De esas que enriquecen. Si bien no creo, ni creeré en las jerarquías, estas existen, y a veces hay que reconocerlas, sobre todo a la hora de pedir el vist i plau. Por eso, y porque creo que así debe ser, comienzo con Pérez de Guzmán, a quien debo reconocer que sin su apoyo y ayuda no hubiese podido hacer lo que más me gusta, cosa que en estos días no es tan fácil, aunque se trate de cosas tan simples como crecer linfocitos. Muchas virtudes para destacar, y pese a algunas peleas ideológicas y desencuentros, debo admitir que tener un jefe con quien poder tratar de tu a tu, no es algo fácil de encontrar. Una compañera más, pero de las buenas. Sigo con Richard, quien creo que en muchos aspectos se parece a la Dolo, al menos en los positivos. Para destacar su sentido común, pragmatismo, inteligencia y su enorme capacidad de trabajo. Una suerte haber podido estar en su laboratorio todos estos años. Otro colega.*

*A la gente del laboratorio. De todos remarco la disposición inmediata y la voluntad por resolver mis dudas. A Martita (cultivador), por su acogida, por su paciencia y disposición para enseñarme a crecer clones. Una excelente maestra. A los pioneros, Manoli, por su eterna colaboración con toda la peña, a la Lidia, por su solidaridad, a Lourance, por su estricto control, a la Laurita y sus viajes en coche, a la Mercé, por sus correcciones y otras vivencias. A la super Mireia y a la super Carme, vaya duo. Continuando con el orden jerárquico, al Manel, primer chofer, por sus charlas (científicas incluidas) mientras aprende a conducir. A la Herrerroski, segundo chofer, por sus terapias psicológicas al borde de su mini bólido rojo, y por las correcciones. A la Rosita Farinera, tercer chofer, por sus cualidades personales, científicas (correcciones incluidas) y por escuchar mis penas en los viajes a Barna. A la Patu (la verga), cuarto chofer, por sus vainas y amor a Chávez. A la super Pili, quinto chofer, por su buena disposición y compañía. A la Pepi, por sus protocolos y consejos. Al Marquito, una especie de Norton viviente. Al Orlando, al Jacobo, a la Vives Pi (Kim), a la Nuria y a la Xesca. A los más nuevos (no tanto), Laia Muchi (la poro) por su colaboración y los buenos momentos con el gran Pelusa. A los super ratones, comenzando por el gordete de Priego, por sus cubatitas, tapitas y lecciones de botánica subética, continuando con la Manicanmen, la Aurorita (prima del gordete o la cuni), la Raquel, la Mar borraste, el Pastoret, a la Cristi (brazu), y al nuevo poli David. Al duo Borrás y Jony de Calgari. A Eva, la valenciana. A la Evita, la morenaza y a la Marian, por su buen rollito. A la Sandra y a la Carme. A las chatis Olguita, Silvi, Marga, Vero y Choli. A ver cuando cambian de uniforme... A Charlie. A la Trini y a la Claudia.*

*Y continuando con lo estrictamente científico, y por orden de visita, a toda la gente de radioterapia, en especial a Juan Cardenal y al Ernest, por la colaboración que han tenido en nuestro proyecto a la hora de irradiar células, fundamental en nuestros protocolos de cultivo celular. A la gente de retrovirología, por su disposición a resolver cualquier tipo de asuntos. A la Mariona, Anuzca, Julita, Cristina, Lidia, al Jordi, a la Margarita, al Juliá, y paro porque son un montón. A la gente del Cis. A la gente de anatomía patológica, Maite, Gustavo, por sus consejos y colaboración para procesar tejido. Al José María, el magno, por sus variados aportes y por su gran humor. A los Dr Alastrue y Cabré, a la hora de obtener cierto tipo de material biológico. A la*

*gente de mantenimiento, especialmente al Mario, de electromedicina. A toda la gente del hospital, por facilitar que las cosas se puedan hacer sin andarse con vueltas, ni mariconadas. Y hablando de hospital, a la gente del Clinic, en especial al gran Ramón Vilella y su eterna colaboración.*

*Al laboratorio de Baires, en especial a Vivi por haberme enseñado a trabajar y a Leito por darme la primera oportunidad de trabajar. A Leonardo por dejarme continuar mi trabajo en Barcelona. A la turquí, al Pando, al Chulu, a la Caraco, a todos. También al servicio de gastroenterología del hospital pediátrico Garrahan, a la Dra Susana de Rosa y a Margarita por su colaboración en la obtención de muestras. A los niños.*

*A el Xavi, un amigo. Una suerte haber estado estos años compartiendo experiencias con él. Un buen representante de la terra. Gracias a él he conocido la montanya y aprendido cantidad de cosas, de las que no están en los libros. Y todo por una salida en bici. Así comenzó la historia. Una buena historia.*

*Siguiendo con la fauna autóctona, una especie en extinción, Aurita. Y no lo digo porque no abunde gente buena en este país, sino porque sus principios de compañerismo y solidaridad son prácticamente únicos. A el Jaume, sobre todo porque contribuirá a mantener la especie, sin diluir la dosis génica. Y a los padres de ellos, la Carme, el Joan, la Carmina y al Jordi, por haberme hecho sentir como en casa.*

*A la Ana (hermosura) y al Dani, dos motivos más que suficientes para escaparte de tu país y no tener que arrepentirte. También están en peligro de extinción.*

*Al Roger, con quien creo haber hecho una mica de país. Historias de la vida, salidas en bici y varias cosas más. Menos mal que la bici no habla, porque si hablara, cuántas cosas te diría...*

*A la Mar, otro fenómeno de buena gente. Y al Pep, al Jordi, a la Isazkun. Al gran Lope. A los compis del piso, David y Titín.*

*Al Hamed y al Pachi (Angel), por su ayuda en la financiación del proyecto, y por los grandes e inolvidables momentos en el Kabara. Y a las chicas....*

*A los de Madrid, Gema, Verónica, Mercedes, Yolanda, Iñaki, Paquito, Raúl y mister Hide. Por los grandes momentos en reuniones científicas y de otro tipo.*

*Al Jordi, la Cristina, al Miguel, al Marc, por su hospitalidad. Y a toda la gente del Lauras, fundamentalmente a los mellizos, Mavi y Alvarito.*

*A mi hermana, Ivana, que entre otras cosas facilito mi comunicaión con Baires.*

*Y por último, aunque seguro que me sigo olvidando de muchos, a Adrian Morelli, a quien más que agradecerle, le dedico este trabajo, por su apoyo y por su ejemplo de dedicación, vocación y sabiduría.*

*Me olvidaba, a las células, que si no hubiesen crecido, vete a saber donde estaría.....*

*A tothom, moltes gracies. De veritat. De tot cor.*

*Kolko.*