

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**CARACTERIZACIÓN DE LINFOCITOS T Y CÉLULAS  
DENDRÍTICAS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD  
INFLAMATORIA INTESTINAL**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR POR**

Noemí Aguilera Montilla

Bajo la dirección de los Doctores:

José Manuel Martín Villa  
Mercedes Pérez Blas

**Madrid, 2004**

**ISBN: 84-669-2599-6**

**FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**



**CARACTERIZACIÓN DE LINFOCITOS T Y  
CÉLULAS DENDRÍTICAS EN PACIENTES CON  
ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL**

**TESIS DOCTORAL**

**NOEMÍ AGUILERA MONTILLA  
MADRID 2004**

# **TESIS DOCTORAL**

## **CARACTERIZACIÓN DE LINFOCITOS T Y CÉLULAS DENDRÍTICAS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL**

AUTOR: Noemí Aguilera Montilla

DIRECTORES: Dr. José Manuel Martín Villa  
Dra. Mercedes Pérez Blas

LUGAR DE REALIZACIÓN: Área de Inmunología  
Facultad de Medicina  
Universidad Complutense de Madrid

**FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
2004**

# Índice

---

	<u>Página</u>
<b>I. Agradecimientos</b>	1
<b>II. Introducción</b>	3
<b>1.- Enfermedad Inflamatoria Intestinal</b>	4
1.1.- Epidemiología	4
1.2.- Etiopatogenia	5
1.2.1.- Factores ambientales	5
1.2.2.- Factores genéticos	7
1.2.3.- Factores inmunológicos	9
1.2.3.1.- Enfermedad de Crohn	11
1.2.3.2.- Colitis Ulcerosa	12
1.2.4.- Factores neuroendocrinos. Alteraciones en el Sistema Nervioso Entérico	13
<b>2.- Linfocitos T</b>	14
2.1.- Activación del linfocito T	14
<b>3.- El Herpesvirus saimiri como modelo</b>	17
3.1.- Características fenotípicas y funcionales de las líneas T-HVS	18
<b>4.- Células dendríticas</b>	19
4.1.- Las células dendríticas en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal	23
<b>5.- Sistema Inmunológico de mucosas</b>	24
<b>5.1.- Organización del MALT</b>	25
5.1.1.- Tejido linfoide organizado	25
5.1.1.1.- Placas de Peyer	25
5.1.1.2.- Nódulos linfáticos mesentéricos	26
5.1.2.- Tejido linfoide difuso	27
5.1.2.1.- Linfocitos de <i>lamina propria</i>	27
5.1.2.2.- Linfocitos intraepiteliales	28
<b>5.2.- Encuentro inicial de antígenos en la mucosa</b>	30
5.2.1.- Células M en la toma de antígenos	30
5.2.2.- Células dendríticas en la toma de antígenos	30
5.2.3.- Células epiteliales en la toma de antígenos	31
<b>III. Objetivos</b>	33
<b>IV. Materiales y métodos</b>	35
1.- Pacientes	36
2.- Obtención de células	36
2.1.- Células mononucleares de sangre periférica	36

2.2.- Células mononucleares de <i>lamina propria</i>	37
2.3.- Células de placas de Peyer	38
3.- Obtención y cultivo de líneas celulares T-HVS	39
4.- Marcaje en superficie. Citometría de flujo	39
5.- Estudios de proliferación celular	39
6.- Estudios de flujo de calcio celular	40
7.- Inmunohistoquímica	40
8.- Inmunofluorescencia	41
8.1.- Inmunofluorescencia directa	41
8.2.- Inmunofluorescencia indirecta	41
9.- Análisis estadístico	41
10.- Consideraciones éticas	42
<b>V. Resultados</b>	<b>51</b>
<b>1.- Estudios en sangre periférica</b>	<b>52</b>
<b>1.1.- Células mononucleares de sangre periférica en fresco</b>	<b>52</b>
1.1.1.- Estudio fenotípico	52
Marcadores generales de linaje celular	52
Marcadores de activación (CD25, CD26 y HLA-DR)	52
Moléculas coestimuladoras (CD28, CD80 y CD86) y CD103	54
1.1.2.- Estudios de proliferación celular	56
<b>1.2.- Líneas celulares T-HVS de sangre periférica</b>	<b>58</b>
1.2.1.- Estudio fenotípico	58
1.2.2.- Estudios de proliferación celular	59
1.2.3.- Estudios de movilización de calcio	62
<b>2.- Estudios en mucosa</b>	<b>64</b>
<b>2.1.- Células mononucleares de mucosa en fresco</b>	<b>64</b>
2.1.1.- Estudio fenotípico	64
Marcadores generales de linaje celular	64
Marcadores de activación (CD25 y HLA-DR)	68
Moléculas coestimuladoras (CD28, CD80 y CD86) y CD103	69
<b>2.2.- Líneas celulares T-HVS de mucosa</b>	<b>72</b>
2.2.1.- Estudio fenotípico	72
2.2.2.- Estudios de proliferación celular	74
2.2.3.- Estudios de movilización de calcio	78
<b>3.- Células dendríticas</b>	<b>80</b>
3.1.- Células dendríticas en distintas localizaciones del tracto intestinal	80
3.2.- Células dendríticas en el tracto intestinal de pacientes con EII	86
3.2.1.- Células dendríticas en placas de Peyer de pacientes con EII	86
3.2.2.- Células dendríticas en mucosa de colon de pacientes con EII	87

<b>VI. Discusión</b>	88
1.- Las diferencias fenotípicas entre células mononucleares en fresco de pacientes con EII e individuos control son distintas en sangre periférica y en mucosa	89
2.- Características fenotípicas de las líneas T-HVS de sangre periférica y de mucosa de pacientes con EII e individuos control	94
3.- Las diferencias funcionales entre las líneas T-HVS de pacientes con EII e individuos sanos son distintas en sangre periférica y en mucosa	97
Estudios de proliferación celular de CMSP en fresco	97
Estudios de proliferación celular en líneas T-HVS de sangre periférica	97
Estudios de proliferación celular en líneas T-HVS de mucosa	99
4.- Los estudios de movilización de calcio en líneas T-HVS muestran variaciones entre células de sangre periférica y de mucosa, y entre pacientes con EII y controles	101
Estudios de movilización de calcio en líneas T-HVS de sangre periférica	101
Estudios de movilización de calcio en líneas T-HVS de mucosa	101
5.- Células dendríticas	102
5.1.- Células dendríticas en distintas localizaciones del tracto intestinal	102
5.2.- Células dendríticas en el tracto intestinal de pacientes con EII	105
5.2.1.- Células dendríticas en placas de Peyer de pacientes con EII	105
5.2.2.- Células dendríticas en mucosa de colon de pacientes con EII	105
<b>VII. Conclusiones</b>	108
<b>VIII. Abreviaturas</b>	111
<b>IX. Bibliografía</b>	115

# **I. Agradecimientos**

---



Quiero expresar mi agradecimiento a los Drs. José Manuel Martín Villa y Mercedes Pérez Blas, por su dirección, ayuda y continuo estímulo en la elaboración del presente proyecto de tesis doctoral.

También me gustaría agradecer a todos los compañeros del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la UCM la ayuda prestada durante estos años, especialmente a Anna Valeri, Mercedes López, Ángeles Mencía y Cristina Rodríguez, con las que he compartido los mejores y los peores momentos.

La estancia en el laboratorio del Profesor Thomas T. MacDonald, su ayuda y la de la Dra. Ute Guenther y todos los compañeros del laboratorio del Departamento de IIR del Southampton General Hospital, han sido esenciales para la realización de esta tesis.

Gracias a mis padres, a mi hermano y a Roberto por su apoyo.

## **II. Introducción**

---

## 1.- Enfermedad Inflamatoria Intestinal

El término Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) se aplica de forma genérica a todo proceso inflamatorio crónico e idiopático del intestino, a diferencia de otras enfermedades inflamatorias en las que el agente etiológico es conocido. Bajo este término se engloban dos entidades: Enfermedad de Crohn (EC) y Colitis Ulcerosa (CU). La Enfermedad de Crohn es una enfermedad inflamatoria crónica granulomatosa y transmural que puede afectar a cualquier punto del tracto digestivo, aunque preferentemente se asienta en el íleon y en el colon, y cuya distribución suele ser discontinua. La Colitis Ulcerosa es una enfermedad inflamatoria crónica recurrente y no granulomatosa de la mucosa del colon. Puede afectar desde el íleon terminal hasta el ano, siendo más frecuente la localización distal, y la distribución es confluyente continua (Oliva-Hemker y Fiocchi 2002). Aproximadamente en un 10% de los casos no es posible realizar un diagnóstico definitivo entre CU y EC de colon y se habla de colitis indeterminada (Meucci *et al* 1999).

Ambas patologías cursan con malabsorción, diarrea, sangrado rectal, fiebre, dolor abdominal y pérdida de peso (Laroux *et al* 2001). Tanto EC como CU pueden tener síntomas extraintestinales, que consisten fundamentalmente en artritis y dolor lumbar, aftas bucales, úlceras cutáneas y alteraciones hepáticas.

### 1.1.- Epidemiología

La Colitis Ulcerosa y la Enfermedad de Crohn son enfermedades que afectan principalmente a adolescentes y adultos jóvenes, con un pico de incidencia entre los 15 y los 30 años de edad (Fiocchi 1998). La incidencia y prevalencia de la EII varían enormemente dependiendo de la localización geográfica y entre distintas razas o grupos étnicos. Se han descrito incidencias de 1-10/100.000 para EC y de 5-18/100.000 para CU, con las tasas más altas en los países escandinavos y Escocia, seguidos por Inglaterra y Norte América, y después Europa Central y del Sur. Entre grupos étnicos, los Judíos Ashkenazis tienen el riesgo más alto de desarrollar EII. Hasta hace poco tiempo, la EII se consideraba rara en afroamericanos, hispanos y asiáticos, sin embargo, la incidencia y prevalencia no se han evaluado con exactitud en razas no caucásicas (Oliva-Hemker y Fiocchi 2002, Russel y Stockbrugger 1996).

En general, existe un mayor riesgo de desarrollar EII en zonas urbanas frente a rurales, en clases socioeconómicas altas frente a bajas, y en países desarrollados frente a poco desarrollados. Se ha observado, además, que la incidencia de EII en una población aumenta cuando esta emigra de un área geográfica de bajo riesgo hacia una zona de riesgo más alto (Andus y Gross 2000).

Existen varios inconvenientes en el estudio epidemiológico de la EII: no se han adoptado universalmente criterios diagnósticos firmes, éstos no se han aplicado de forma similar en todos los estudios y la información usada para clasificar a los pacientes no se puede obtener fácilmente al estudiar poblaciones a gran escala. Además, el intervalo de tiempo entre un evento inicial y el comienzo de los síntomas clínicos o el tiempo de diagnóstico puede ser prolongado, de manera que

la asociación entre causa y efecto son particularmente difíciles. Una desventaja adicional es que la mayoría de los estudios retrospectivos no tienen en cuenta los casos categorizados como colitis indeterminada, aunque sí se están considerando en estudios más recientes (Oliva-Hemker y Fiocchi 2002).

## **1.2.- Etiopatogenia**

A pesar del ingente esfuerzo investigador realizado desde hace décadas, la etiopatogenia de la EII continúa siendo desconocida. Al menos dos son las razones: la falta de un modelo experimental aceptado como representativo de la enfermedad; y la profusión de alteraciones halladas y la dificultad para distinguir entre cuáles son esenciales y cuáles no. No obstante todo ello, los estudios epidemiológicos sugieren fuertemente que en la patogenia de la EII están implicados factores ambientales y una predisposición individual genéticamente determinada.

### **1.2.1.- Factores ambientales**

Varios datos epidemiológicos apoyan la implicación de factores ambientales en la etiopatogenia de la EII, como la mayor frecuencia en países industrializados, el aumento de la incidencia paralelo al aumento del desarrollo de un país, la frecuencia creciente al adoptarse costumbres occidentales, la aparición de la enfermedad 10 años después de haber emigrado de un país del tercer mundo a un país desarrollado, y la mayor frecuencia en áreas urbanas que rurales (Schreiber *et al* 1992).

Se han investigado numerosos posibles factores ambientales de riesgo, muchos de ellos asociados con EC o CU, pero ninguno de ellos ha sido identificado como causal (Andus y Gross 2000). Hasta la fecha, el hábito de fumar es el único factor ambiental que, se ha demostrado, está fuertemente asociado con el desarrollo de EII. Sin embargo la relación causa-efecto entre fumar y esta enfermedad permanece desconocida tanto para EC como para CU. Se ha descrito que el tabaco afecta a ambas de forma opuesta: mientras que los fumadores presentan un mayor riesgo de desarrollar EC, fumar, y la exposición pasiva al tabaco en la infancia, protege frente a CU (Calkins 1989, Sandler *et al* 1992).

Otros factores ambientales identificados incluyen los anticonceptivos orales, que tienen una débil asociación con EII, apendicectomía (con un efecto protector frente al desarrollo de CU), varios constituyentes de la dieta, infecciones y eventos perinatales.

Numerosos estudios tratan de la relación entre la composición de la dieta, o el tiempo de exposición a antígenos dietéticos y el posterior desarrollo de EII. Los alimentos más estudiados han sido el azúcar refinado, los ácidos grasos saturados y las fibras vegetales. Según varios trabajos, existe un mayor consumo de hidratos de carbono, en particular azúcar refinado, en pacientes con EC (Martín y Brandes 1980, Mayberry *et al* 1980). Sin embargo, estos descubrimientos podían reflejar estilos de vida comunes en poblaciones con EII, más que una verdadera relación de causa-efecto

que refleje un verdadero factor de riesgo. Otros autores sugieren efectos terapéuticos de los ácidos grasos omega-3 en EC y CU, lo cual hace pensar en un posible papel de los lípidos en la EII. Aunque, en este caso, tampoco se ha establecido un papel claro para las grasas de la dieta como causante real del desarrollo de EII. Tampoco proporcionan resultados concluyentes los estudios sobre el efecto de frutas y verduras sobre la EII, aunque algunos han sugerido una relación negativa entre el consumo de alimentos que contienen fibra y el desarrollo de la enfermedad. En general, los estudios epidemiológicos dietéticos no han sido muy útiles, principalmente porque se basan en métodos imprecisos como historias dietéticas, cuestionarios y recuerdos, que no permiten la identificación de verdaderos antígenos dietéticos relevantes (Andus y Gross 2000).

Además, los investigadores se han centrado en la lactancia o en la exposición temprana a antígenos de la dieta como posibles factores de riesgo de aparición de EII. Algunos estudios consideran que la lactancia protege contra esta patología, aunque los datos varían dependiendo de la población de estudio y los análisis estadísticos aplicados. También se ha sugerido durante largo tiempo la posible relación entre la intolerancia a la proteína de la leche de vaca y la EII, pero es difícil confirmar la existencia de una relación causal entre ambas (Oliva-Hemker y Fiocchi 2002).

Por otra parte, se ha investigado la exposición a agentes infecciosos en la infancia. Se postula que las infecciones, principalmente intestinales, podrían actuar como posibles efectos activadores de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal en individuos genéticamente predispuestos, o bien, que las infecciones lleven a un Sistema Inmunológico no completamente desarrollado a generar respuestas cruzadas frente a autoantígenos. Algunos autores han publicado que existe una mayor incidencia de gastroenteritis y diarrea en la infancia de pacientes que posteriormente desarrollaron EC (Whorwell 1979), mientras que un estudio internacional multicentro no encontró diferencias en la frecuencia de gastroenteritis entre pacientes y controles (Gilat *et al* 1987).

Pese a que todos los esfuerzos para identificar un agente infeccioso causante de la EII han sido infructuosos, y tampoco existe un soporte epidemiológico para un agente transmisible, puesto que no se trata de una enfermedad contagiosa, no puede descartarse una infección no convencional sobre todo por micobacterias, o el efecto de productos bacterianos. Las sospechas sobre las micobacterias, principalmente *Mycobacterium tuberculosis*, surgen por ser el agente causal de la enteritis crónica en animales, por haberse obtenido resultados terapéuticos beneficiosos con fármacos antimicobacterianos en pacientes con EC, y haberse hallado en cultivos de tejido intestinal de muchos pacientes con EC, cuando se mantiene en cultivo largo tiempo y se utiliza una técnica muy sensible como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Se ha referido que el hombre se infectaría al entrar contacto con animales infectados, aguas contaminadas o leche y derivados no pasteurizados o en los que sobreviviera el *Mycobacterium tuberculosis*. No obstante, algunos datos no apoyan esta hipótesis: *M. tuberculosis* no se ha detectado en todos los especímenes intestinales de EC examinados y, por el contrario, se ha detectado en intestino de pacientes sin esta enfermedad; no todos los pacientes con EC tienen anticuerpos frente a este microorganismo y, en definitiva, *Mycobacterium tuberculosis* no cumple los postulados de Koch necesarios para implicar un

germen como causa de una enfermedad. La sospecha de una etiología infecciosa junto al fracaso en la detección de un germen universal han llevado a pensar que la causa podría ser algún producto bacteriano como endotoxinas, péptidos bacterianos (peptidoglicán-polisacárido), fragmentos de pared bacteriana, o proteínas virales (viriones, priones) procedentes de gérmenes intestinales comensales o patógenos (Jayanthi *et al* 1991).

La hipótesis opuesta es la del “niño protegido”: debido al aumento en la higiene, un niño podría estar sobreprotegido frente a la exposición a agentes infecciosos comunes en el ambiente. Si después se produce una exposición tardía, se puede generar una respuesta inmunológica inadecuada, que podría llevar al desarrollo de un proceso inflamatorio anormal, y a EII. Esta hipótesis explica el hecho de la mayor prevalencia de EII en los países desarrollados. Sin embargo, el estudio internacional anterior, que examinó factores relacionados con la potencial exposición a condiciones que favorecen la infección, como el ambiente en el hogar, atención diaria y exposición a mascotas o sitios públicos, no fue posible demostrar que la protección en la infancia, contribuyese a la etiología de la EII (Gilat *et al* 1987).

A la vista de los resultados, se debe tener en cuenta la posibilidad de que ninguno de los factores anteriores sea el único responsable de la patogénesis de la EC o la CU, sino que sería una combinación de factores la que explicaría la frecuencia creciente de EII en poblaciones donde previamente no era común. La combinación de hogares protegidos, falta de exposición a parásitos intestinales, y la exposición a nuevos antígenos creados por cambios sociales pueden llevar a un aumento en la susceptibilidad del huésped. Al mismo tiempo, la mejor higiene y sanidad, la alimentación y el agua más limpias y la nutrición selectiva debida al progreso social y económico pueden limitar la frecuencia y la variedad de estimulación antigénica para el Sistema Inmunológico (Oliva-Henker y Focchi 2002).

### **1.2.2.- Factores genéticos**

Estudios familiares y de gemelos, así como la evidencia de agregación étnica, sugieren que los factores genéticos juegan un papel importante en la determinación de susceptibilidad a padecer EII.

Varios estudios muestran que el 10-20% de los pacientes tienen una historia familiar positiva, indicando que el mayor factor de riesgo para desarrollar EII es tener otros miembros de la familia con la enfermedad, y este riesgo familiar es mayor para EC que para CU (Yang *et al* 1993). Una revisión de 12.000 pacientes daneses con diagnóstico de EII entre 1977 y 1992 revela que el riesgo de EC o de CU entre su descendencia es de 2 a 13 veces mayor que el de la población general (Orholm *et al* 1999).

En cuanto a la asociación con antígenos de histocompatibilidad, un porcentaje razonable (50-70%) de pacientes con EII expresan HLA-B27 y en un determinado tipo de EC se ha visto un aumento de HLA-B62, que posiblemente tiene un efecto protector frente a síntomas músculo esqueléticos, pero predispone a padecer EII (Karlinger *et al* 2000).

Durante la última década ha aumentado enormemente el interés por la búsqueda de genes de la EII. Se han utilizado variedad de métodos para detectar influencias genéticas, incluyendo análisis de genes candidatos que codifican varias proteínas implicadas en la inmunorregulación, como son alelos HLA, citocinas, como factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), antagonista del receptor de interleuquina-1 (IL-1ra), moléculas de adhesión celular y, finalmente, proteínas estructurales. Sin embargo esta aproximación está basada en el conocimiento actual de la patogénesis de la EII y hasta la fecha no se ha conseguido identificar genes de susceptibilidad a CU o EC para la mayoría de los pacientes. Por otra parte, se ha abordado la búsqueda desde un análisis de ligamiento o búsqueda genómica amplia, ya que se pensó que ésta es una herramienta suficientemente poderosa para encontrar genes de susceptibilidad en desórdenes genéticamente complejos como EC y CU (Satsangi *et al* 1997).

La ventaja de esta técnica sobre el análisis de genes candidatos, es que los estudios de ligamiento no dependen del conocimiento actual ni de la hipótesis de patogénesis, permitiendo así el descubrimiento de genes que podrían no haberse sospechado. De hecho, gracias a esta técnica se encontró una localización genética en el cromosoma 16 humano, llamada IBD1, que contribuye a la susceptibilidad a EC (Hugot *et al* 1996, Ohmen *et al* 1996) y más recientemente se ha identificado el gen *nod2*, localizado en la región 16q12 de IBD1.

Una mutación en el marco de lectura de *nod2*, y el polimorfismo en dos nucleótidos, se han asociado con la susceptibilidad a EC. La frecuencia alélica de mutaciones de *nod2* es de dos a tres veces superior en pacientes de EC (8-12%) que en la población general (2-4%). El gen *nod2* codifica una proteína expresada en monocitos que confiere sensibilidad al lipopolisacárido bacteriano y que interacciona con RICK, un mediador de activación de NF- $\kappa$ B. La mutación del marco de lectura resulta en una proteína truncada que pierde parte del último dominio LRR (*leucine-rich repeat*) y es deficiente en la inducción de activación de NF- $\kappa$ B mediada por LPS (Hugot *et al* 2001, Ogura *et al* 2001). La disminución de la activación de NF- $\kappa$ B se ha encontrado en los tres alelos de *nod2* de mayor riesgo. Esto lleva a la conclusión de que esta disminución de activación de NF- $\kappa$ B en la vía de activación de *nod2* está implicada en la susceptibilidad a EC. La deficiencia en NF- $\kappa$ B en ciertas poblaciones celulares podría incrementar la susceptibilidad a inflamación intestinal (Bonen *et al* 2003). El mecanismo por el que las variaciones genéticas de *nod2* aumentan la susceptibilidad a EC no está claro. Es posible que NOD2 actúe en una vía de señalización implicada en la defensa contra bacterias entéricas. Según este modelo, NOD2 mantendría bajo vigilancia ciertas bacterias entéricas en el intestino, y esta función protectora sería defectuosa en individuos con NOD2 mutante. Este defecto podría llevar a una respuesta mediada por células T anormal, inflamación del tejido y producción aberrante de citocinas, propias de EC (Inohara *et al* 2002).

Estudios realizados por Podolsky y cols. sugieren que la proteína NOD2/CARD15 está presente no sólo en monocitos, sino en el epitelio del colon, y la forma mutante da lugar a una resistencia disminuida ante las bacterias invasivas (Podolsky 2002).

Sin embargo, *nod2* no es el único gen responsable de la EC, ya que se han implicado múltiples *loci* de susceptibilidad adicionales en varias poblaciones. Además, *loci* de EII individuales pueden tener un distinto grado de importancia entre grupos étnicos diferentes debido a que las distintas poblaciones pueden tener diferentes proporciones de alelos, y a que los factores ambientales pueden interactuar de manera variable con diferentes *loci* dependiendo de la localización geográfica (Oliva-Hemker y Flocchi 2002).

### 1.2.3.- Factores inmunológicos

La evidencia acumulada indica que la EII resulta de una activación de la respuesta inmunológica e inflamatoria ante la flora intestinal o sus productos. Variaciones genéticamente determinadas en funciones del Sistema Inmunológico de mucosas, como la activación celular por moléculas patrón de bacterias, llevan a una susceptibilidad diferencial al desarrollo de esta patología. Una explicación más detallada del Sistema Inmunológico de la mucosa se encuentra en el punto 5 de la introducción de esta tesis.

Varias observaciones experimentales indican que una respuesta alterada de la mucosa es central en la patogénesis de la EII y existen una serie de rasgos que definen la Enfermedad Inflamatoria Intestinal como una patología de perfil inmunológico. La presencia de un infiltrado abundante de linfocitos y monocitos/macrófagos en la mucosa intestinal es característica de pacientes con EII, si bien permanece sin resolver la cuestión de si esta inflamación persistente en la EII es una alteración primaria de la respuesta inmunológica, o es una consecuencia de una estimulación constante de una respuesta normal, debida a un defecto en la barrera intestinal o a una respuesta epitelial a la flora del *lumen*, que lleven a un aumento en la permeabilidad intestinal y por tanto a un exceso de presentación antigénica (Podolsky 2002).

La existencia de autoanticuerpos anti antígenos citoplásmicos perinucleares en neutrófilos (p-ANCA) y anti células epiteliales intestinales en CU se ha considerado una indicación principal de la contribución del Sistema Inmunológico a la patogénesis de la EII (Harrison 1965, Hibi *et al* 1994, Kappeler y Mueller 2000, Saxon *et al* 1990, Seibold *et al* 1992). La asociación de la EII con enfermedades autoinmunes (sacroileítis, uveítis, colangitis esclerosante, tiroiditis), la aparición frecuente de complicaciones extraintestinales, la respuesta favorable a medicamentos inmunomoduladores (prednisona, azatioprina, ciclosporina,...) y, sobre todo, las múltiples alteraciones inmunológicas tanto sistémicas como intestinales, halladas en los pacientes con EII, apoyan la hipótesis de que el Sistema Inmunológico tiene un papel crítico en la patogénesis de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

Varios modelos animales sugieren que un fallo en la regulación de la respuesta inmunológica mediada por células, normalmente protectora, lleva a una activación sostenida del Sistema Inmunológico de mucosas y a la producción incontrolada de citocinas y mediadores proinflamatorios (Laroux *et al* 2001). Estos modelos incluyen ratones con alteraciones en subpoblaciones de células T y selección de células T, ratones deficientes en las cadenas  $\alpha$  o  $\beta$  del TcR, MHC de clase II, o



ratones SCID reconstituidos con células T CD4<sup>+</sup>CD45R<sup>bright</sup>, ratones que desarrollan colitis como resultado de la delección de genes de IL-2, IL-10 o TGF- $\beta$ ; o ratones deficientes en ciertas proteínas de señalización celular como G<sub>ai2</sub> (Blumberg *et al* 1999, Strober 2002). De estos modelos se puede deducir que la mayoría de los eventos inmunoreguladores de inflamación de las mucosas están controlados por linfocitos T CD4. Una segunda conclusión es que la inflamación crónica del intestino puede resultar tanto de una diferenciación de células T CD4 hacia Th1 como hacia Th2 y la acción de estas células puede ser suprimida por citocinas producidas por células T reguladoras (Tr) y Th3 (Groux y Powrie 1999).

Las células Th1 secretan IL-2, IFN- $\gamma$  y linfotóxina- $\alpha$  mientras que las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13. Las células Th0 pueden sintetizar y liberar tanto citocinas Th1 como Th2. Las células Th3 y las células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> producen TGF- $\beta$  (*transforming growth factor*) e IL-10, respectivamente. Son las propias citocinas las que determinan la polarización de las células T CD4. La IL-12 y la IL-4 inducen la generación de las subpoblaciones Th1 y Th2 respectivamente y a su vez inhiben la producción de la subpoblación contraria. La IL-18 también es importante en el desarrollo de la respuesta Th1. No induce diferenciación Th1 por sí sola, pero aumenta la respuesta Th1 dependiente de IL-12, probablemente aumentando la expresión del receptor IL-12R $\beta$  en células T y la activación del promotor de IFN- $\gamma$  por AP-1 (*c-fos/c-jun*). Por otra parte, la IL-13 es importante para la diferenciación hacia Th2. Esta citocina es capaz de producir esta diferenciación, y la síntesis de IgE de manera independiente de IL-4 en determinadas ocasiones. Las fuentes de estas citocinas *in vivo* han sido tema de debate; actualmente se sugiere que las células dendríticas tienen un papel clave en el compromiso de las células Th hacia uno u otro linaje (Neurath *et al* 2002).

Por último, los modelos animales de inflamación intestinal indican que la activación de los linfocitos T de la mucosa es dependiente de antígeno, y que los antígenos responsables proceden de las bacterias intestinales, ya que los animales mantenidos bajo condiciones libres de gérmenes estrictas no desarrollan la enfermedad (Kappeler y Mueller 2000, Laroux *et al* 2001, MacDonald 1999). El resultado de los estudios en animales sugiere que la respuesta inmunológica de mucosas que se da normalmente por defecto, ante agentes entéricos inocuos implica respuestas Th2, Th3 o ambas (Iwasaki y Kelsall 1999, Shanahan 2002). Sin embargo en humanos la respuesta de mucosas normal parece estar desviada hacia Th1, aunque esto probablemente es variable, y está afectado por factores genéticos y ambientales, incluyendo la composición de la flora (MacDonald y Monteleone 2001, Nagata *et al* 2000). La mayoría de los modelos animales de inflamación intestinal crónica mediados por células Th1 muestran una inflamación transmural como la que presentan los pacientes con EC. Por el contrario, al menos algunos de los modelos Th2 se caracterizan por inflamación superficial del colon e hiperplasia epitelial, propia de pacientes con CU (Neurath *et al* 2002). Sin embargo, aunque la hipótesis de que la EC es un desorden mediado predominantemente

por células Th1 está ampliamente demostrado, no ocurre lo mismo con la relación de la CU con un respuesta Th2.

### 1.2.3.1.- Enfermedad de Crohn

La Enfermedad de Crohn activa se caracteriza por un aumento en el número de linfocitos T secretores de IFN- $\gamma$ , y por una producción aumentada de citocinas que activan a los linfocitos Th1 en la mucosa (IL-12 e IL-18) (Fuss *et al* 1996, MacDonald *et al* 2000, Okazawa *et al* 2002). Los linfocitos de *lamina propria* (LLP) de pacientes muestran una producción de IFN- $\gamma$  aumentada respecto a la de individuos control, mientras que la producción de IL-4 se encuentra disminuida y la de IL-5 es similar a la de LLP control. Sin embargo la EC también se asocia con una producción reducida de IL-2 tras la activación de LLP, lo cual no concuerda con una respuesta Th1 pura. Sin embargo, se ha descrito tanto la disminución como el aumento de la producción de IL-2 por LLP de pacientes con EC bajo distintas condiciones (Fuss *et al* 1996). Gonsky y cols encuentran una mayor expresión de AP-1 tras la activación vía CD2 en extractos de mucosa de pacientes con EC que en controles. Las nucleoproteínas AP-1 se unen al promotor de la IL-2 y activan la transcripción del gen de la IL-2 (Gonsky *et al* 1998).

Por otra parte, el tratamiento con anticuerpo anti TNF- $\alpha$  tiene efectos beneficiosos en el desarrollo de la EC, pero no de la Colitis Ulcerosa (Agnholt y Kaltoft 2001). El efecto de este tratamiento podría deberse a que contrarresta la producción de esta citocina por los linfocitos T activados.

En individuos sanos, los linfocitos T activados están controlados, al menos, por dos mecanismos y ambos parecen estar alterados en pacientes con Enfermedad de Crohn (Shanahan 2002). Por un lado, las subpoblaciones reguladoras de linfocitos T, que tienen la capacidad de controlar o prevenir la inflamación. La actividad inmunosupresora de estas células requiere producción de IL-10 y TGF- $\beta$ , y es dependiente de señalización a través de CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), que es un regulador negativo de la activación de las células T. Una deficiencia en estas células reguladoras parece estar implicada en la patogénesis de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (Groux y Powrie 1999). Un segundo nivel de regulación es la inducción de apoptosis en las células T activadas, una vez que ha tratado con el patógeno. Los linfocitos T de *lamina propria* de pacientes con EII, tanto EC como CU, muestran una apoptosis defectuosa inducida por Fas, tras la activación vía CD2. Además, las células de pacientes con EC son más resistentes a la apoptosis debida a la privación de IL-2 y a la apoptosis mediada por óxido nítrico. Esto lleva a la acumulación de linfocitos en la mucosa y a la perpetuación de la respuesta inflamatoria (Boirivant *et al* 1999, Ina *et al* 1999). Probablemente, la resistencia a apoptosis de los linfocitos de *lamina propria* en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal, no es la causa primaria de la enfermedad, sino un efecto secundario de la inflamación que lleva al empeoramiento de la misma (Neurath *et al* 2001).

Las células Th1 activan potentemente a los macrófagos, para producir citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ , y quimiocinas como IL-8, que se han encontrado elevadas tanto a nivel intestinal como en el suero de pacientes con EC. Estas citocinas proinflamatorias, especialmente el TNF- $\alpha$ , contribuyen al daño intestinal, ya que alteran la integridad de las membranas epiteliales y endoteliales, aumentan el reclutamiento de células inflamatorias y ejercen un papel central en la formación de granulomas (Romagnani *et al* 1997).

### 1.2.3.2.- Colitis Ulcerosa

La naturaleza de la respuesta de las células T en CU no está clara. Fuss y cols. demuestran que la secreción de citocinas por los LLP de pacientes con CU es muy diferente a la de pacientes con EC. En este caso la secreción de IL-5 por LLP activados vía CD3/CD28 se encuentra notablemente aumentada, mientras que la de IFN- $\gamma$  e IL-2 son similares a la de controles. Estos datos concuerdan con una respuesta Th2 dominante en CU, sin embargo éste y otros grupos encuentran una producción disminuida de IL-4 por los LLP de estos pacientes, al contrario de lo que se esperaría en una respuesta Th2 (Fuss *et al* 1996, MacDonald *et al* 2000).

La Colitis Ulcerosa podría estar asociada a una respuesta Th2 dado que existe una respuesta de anticuerpos IgG, probablemente T-dependiente y generada en el GALT organizado. En el intestino inflamado de pacientes con CU abundan las células plasmáticas IgG<sup>+</sup> y se ha encontrado IgG1 junto con el componente C3b del Complemento en la superficie de las células epiteliales (MacDonald *et al* 2000). Además otros hechos relacionan la CU con autoinmunidad mediada por anticuerpos, como la existencia de anticuerpos anti antígenos citoplásmicos perinucleares en neutrófilos (p-ANCA) y anti tropomiosina epitelial en los pacientes (Harrison 1965, Hibi *et al* 1994, Kappeler y Mueller 2000, Saxon *et al* 1990, Seibold *et al* 1992).

A pesar de que los eventos desencadenantes de la EC y de la CU son distintos, algunas de las alteraciones inmunológicas se dan en ambas patologías. Los macrófagos de *lamina propria* de pacientes con EII, tanto EC como CU, secretan niveles más altos de IL-15 o IFN- $\gamma$  tras estimulación con LPS que los de individuos control. Además, los linfocitos T de *lamina propria* de pacientes son más sensibles a la IL-15 que los linfocitos T de controles, con la consiguiente inducción de la proliferación y de la producción de IFN- $\gamma$  y TNF, sobre todo en pacientes con EC (Liu *et al* 2001). La IL-16, interleucina con potente actividad quimiotrayente de células CD4<sup>+</sup> y que activa la expresión y producción de otras citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-15 y TNF- $\alpha$  por monocitos humanos, también se encuentra aumentada en la mucosa del colon de pacientes con EC y CU (Seegert *et al* 2001). Asimismo, se ha encontrado que en los macrófagos de *lamina propria* de pacientes con EC y con CU se encuentra aumentada la actividad de unión a DNA del factor nuclear NF- $\kappa$ B, que juega un papel fundamental en la regulación de genes de citocinas. Asimismo existe una producción aumentada de IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  por parte de los macrófagos de *lamina propria* (Neurath *et al* 1998).

EC y CU comparten procesos inflamatorios caracterizados por altos niveles de citocinas proinflamatorias, radicales libres, enzimas degradadoras de la matriz y factores de crecimiento. En ambas patologías se encuentran aumentados los niveles de citocinas como IL-1, IL-6 e IL-8, tanto en la mucosa intestinal como en sangre periférica (Gotteland *et al* 1999, Ishiguro 1999, Neurath *et al* 1998). Las citocinas tienen un efecto deletéreo sobre las células intestinales, además inducen sobreexpresión de moléculas de adhesión vascular que permiten la llegada de más células inflamatorias al intestino, perpetuándose así la inflamación. Los radicales libres producidos por células inflamatorias, principalmente los neutrófilos, tienen un papel principal en el daño de la mucosa durante la inflamación aguda. Por otra parte las células del estroma de pacientes con EII, activadas por citocinas proinflamatorias, producen altos niveles de metaloproteinasas (colagenasas, estromelisin, gelatinasas, *membrane type metalloproteinases*) que son capaces de degradar la matriz extracelular (Pender *et al* 2000). Las células del estroma de pacientes con EII activa expresan niveles elevados de factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), implicado en la proliferación epitelial aumentada característica de la inflamación intestinal moderada (MacDonald *et al* 2000).

De lo anteriormente expuesto se deduce que los linfocitos T son importantes en el proceso inflamatorio observado en el intestino. Las células dendríticas son las células presentadoras de antígeno más eficaces en la activación de linfocitos T vírgenes, por lo que su papel en el desencadenamiento de una respuesta alterada en la mucosa de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal puede ser fundamental. Detalles de ambos tipos celulares se muestran a continuación.

#### **1.2.4.- Factores neuro-endocrinos. Alteraciones en el Sistema Nervioso Entérico**

El Sistema Nervioso Entérico (SNE) controla las secreciones exocrinas y endocrinas, la motilidad y la microcirculación en el tracto gastrointestinal. Está considerado como un sistema integrado comparable al Sistema Nervioso Central (SNC), capaz de mediar actividades reflejas independientemente del SNC. Las células gliales entéricas (CGE) representan el equivalente morfológico y funcional de los astrocitos del SNC. Forman una red con funciones tróficas y protectoras para las neuronas entéricas, y parecen ser elementos activos del SNE durante la inflamación intestinal (Cabarrocas *et al* 2003).

Recientemente se ha sugerido la posible implicación patofisiológica de las células gliales entéricas en la EII humana. Estudios con ratones transgénicos han demostrado que la ablación específica de dichas células induce una patología intestinal similar a las fases tempranas de la EC (Bus *et al* 1998, Cornet *et al* 2001). En pacientes con EC se ha encontrado una red de CGE disminuida previa a la inflamación de la mucosa, que podría representar una causa del aumento de permeabilidad intestinal característico de esta patología. La permeabilidad aumentada podría, consecuentemente, llevar a reacciones inmunológicas anormales frente a antígenos de la dieta y componentes de la microflora intestinal (Cabarrocas *et al* 2003).

## 2.- Linfocitos T

Lo expuesto anteriormente demuestra el papel predominante que juegan los linfocitos T en la patogénesis de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Concretamente, los linfocitos Th1 intervienen en la Enfermedad de Crohn. El desarrollo de Colitis Ulcerosa depende también de los linfocitos T, en este caso Th2, aunque de manera no tan clara o específica como en la Enfermedad de Crohn.

Los linfocitos T son un componente esencial de la respuesta inmunológica adaptativa. Se han identificado dos linajes de linfocitos T distintos según que el tipo de receptor para antígeno (TcR) esté constituido por las cadenas  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$ . Tanto el TcR $\alpha\beta$  como el TcR $\gamma\delta$  se asocian al complejo CD3, encargado de la transducción de señales. Las cadenas del CD3 están formadas por dos heterodímeros CD3 $\gamma\epsilon$  y CD3 $\delta\epsilon$ , y por el homodímero  $\zeta\zeta$ , aunque no se conoce la estequiometría exacta del complejo (Davis *et al* 2003, Poli y Bordignon 2003).

El TcR $\alpha\beta$  predomina en todos los mamíferos y reconoce fragmentos de antígenos, normalmente péptidos, unidos a moléculas MHC. Los linfocitos T $\gamma\delta$  no se conocen tan bien. En unos casos reconocen la superficie de moléculas intactas, y en otros pueden detectar pequeñas moléculas que contienen fosfato, probablemente presentadas por moléculas desconocidas en la superficie de las células (Davis *et al* 2003). Las células TcR $\alpha\beta$  a su vez se subdividen en células T cooperadoras (T *helper*, Th) y células T citotóxicas (Tc). Los linfocitos T cooperadores expresan la molécula CD4 y secretan citocinas y otros factores cuando reconocen antígenos presentados por moléculas MHC de clase II. Son particularmente importantes en la inducción de proliferación de las células B y de su maduración hacia células secretoras de anticuerpos. Probablemente también realizan la misma función para otras células del Sistema Inmunológico. Los linfocitos T citotóxicos expresan CD8 en su superficie y provocan la muerte de las células sobre las que reconocen antígenos extraños unidos a moléculas MHC de clase I (Davis *et al* 2003).

### 2.1.- Activación del linfocito T

La unión simultánea del receptor TcR/CD3 y los correceptores CD4 o CD8 al mismo complejo MHC/péptido presentes en la célula presentadora de antígeno (APC) induce la aproximación de la tirosina quinasa de la familia Src, Ick, asociada a CD4/CD8, hacia las cadenas CD3. Esto resulta en la fosforilación de dos residuos de tirosina conservados en los motivos ITAM (*immune receptor tyrosine-based activation motifs*) que contienen las cadenas del complejo CD3. La fosforilación de las cadenas  $\zeta$  les permite unirse a ZAP-70, tirosina quinasa citosólica de la familia Syk, que se asocia a  $\zeta$  a través de dos dominios SH2 (*Src homology 2*). Tras la unión, ZAP-70 es fosforilada en residuos de tirosina y una vez activada inicia una cascada de señalización. Tanto Ick como ZAP-70 son esenciales para la transducción de señales desde el TcR. Otra clase de proteínas tirosina quinasa (PTK) está implicada en la señalización, Itk, Tec quinasa miembro de la familia Itk-Btk que activa la fosfolipasa C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) (Carmo *et al* 1999, Lewis *et al* 2001, Yamasaki *et al* 1996).

La activación de ZAP-70 lleva a tres importantes vías de activación, dos de las cuales se inician por la fosforilación y activación de la PLC- $\gamma$ . Esta enzima corta el fosfatidil inositol bifosfato (PIP2) para generar diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). El IP3 provoca un repentino aumento del calcio intracelular, que activa a la calcineurina, una fosfatasa citoplasmática que permite al factor de transcripción NF-AT translocarse al núcleo. La actividad transcripcional total de NF-AT requiere un miembro de la familia de factores de transcripción AP-1, dímeros de miembros de las familias Fos y Jun de reguladores transcripcionales. El DAG junto con el calcio intracelular activan la proteína quinasa C (PKC), que a su vez activa el factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Una tercera vía de señalización iniciada por la activación de ZAP-70, es la activación de Ras, y la subsiguiente activación de una cascada de quinasas MAP (*mitogen-activated protein kinases*), que culmina con la activación de Fos y, así, del factor de transcripción AP-1. La proteína de unión a nucleótidos p21Ras en su forma activa, unida a GTP, se acumula rápidamente tras la activación del TcR. Su unión a GTP depende de las proteínas GEF (*guanine nucleotide exchange proteins*) que son activadas por ZAP-70 fosforilado. La hidrólisis del GTP unido por Ras, lleva a su inactivación. Esta actividad GTPasa intrínseca de Ras es estimulada por las proteínas GAP (*GTPase activating proteins*). La activación de Ras es esencial para la inducción de genes de citocinas (Acuto y Cantrell 2000).

La activación del TcR también lleva a la activación de otra proteína implicada en el metabolismo de los lípidos de membrana, la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K), que fosforila el PIP2 para producir PIP3. los productos de la PI3K, PIP3 y PI2 se unen a dominios PH (*plestrin homology*) de proteínas como las Tec quinasas (Itk/Btk), que regulan la actividad de la PLC- $\gamma$ , o de una serina/treonina quinasa, proteína quinasa B (PKB), que intervienen en el control del ciclo celular y en la inhibición de la exportación de NF-AT del núcleo (Acuto y Cantrell 2000, Lewis *et al* 2001).

Juntos, NF-AT, NF- $\kappa$ B y AP-1 inician la correspondiente transcripción génica, que resulta en la diferenciación, proliferación y acciones efectoras de las células T (Janeway *et al* 2000).

Durante la última década se ha demostrado que para la activación celular, además de estas moléculas de señalización intracelular (quinasas, fosfatasa, proteínas G o factores de cambio de nucleótidos de guanina), son necesarias un grupo de proteínas adaptadoras que median de manera constitutiva o inducible en la unión proteína-proteína o proteína-lípido con otros componentes de la vía de señalización. Los adaptadores son proteínas sin actividad enzimática o transcripcional y se caracterizan por poseer dominios de unión modular como SH2, SH3, o PH, o dominios de señalización basados en tirosinas. Su función principal es la de integrar señales en el interior celular y unir receptores de señales con los sistemas efectoras intracelulares. Funcionalmente se pueden dividir en adaptadores que ejercen funciones reguladoras positivas, como LAT, SLP-76, SLP-65, Gads, etc y las que poseen funciones reguladoras negativas, como PAG, SLAP, Dok, etc. Algunas de estas proteínas adaptadoras se encuentran en compartimentos de membrana como "islas o balsas flotantes" llamadas GEMs o DIGs, que se caracterizan por una composición de lípidos particular (están enriquecidas en colesterol y glicoesfingolípidos), la acumulación de proteínas con

glicosilfosfatidilinositol (GPI) y la presencia de variedad de moléculas importantes para la señalización como Src-PTKs, proteínas G, LAT, PAG, etc. Tanto las proteínas adaptadoras como la integridad de estas GEMs, son esenciales para la señalización celular a través del TcR (Leo y Schraven 2001, Viola A 2001).

Las señales de activación iniciadas en el TcR determinan la especificidad de la activación de la célula T, pero otros eventos, iniciados por otras moléculas de membrana como los correceptores CD4/CD8, coestimuladores como CD2, CD28 o integrinas, modulan el umbral de la señalización intracelular requerida para iniciar una respuesta inmunológica. El modelo de las dos señales para la activación del linfocito T propone que es necesaria una señal procedente del complejo TcR/CD3 y otra señal generada por receptores coestimuladores para que se de el proceso de activación (Bromley *et al* 2001).

CD28 es la principal molécula coestimuladora, y colocaliza con el TcR en la región de la sinapsis inmunológica. Sus ligandos son, al menos, B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86). La activación de CD28 lleva al aumento de fosforilación de varias proteínas, incluyendo Ick, Fyn, e Itk y el dominio intracelular del mismo CD28. Esto último permite la unión de CD28 al dominio SH2 de la PI3K, que lleva a un aumento de su actividad (Hutchcroft *et al* 1995). Además de cooperar en la señalización a través del TcR, CD28 activa una vía de activación distinta que lleva al transporte de moléculas de superficie al lugar de sinapsis, influye en la transcripción nuclear directamente y bloquea la salida de NF-AT del núcleo, aumentando así el efecto de esta familia de factores de transcripción (Davis *et al* 2003).

CD2 es otra molécula coestimuladora que tras la unión con su ligando CD58 contribuye a la estabilización de la interacción de la célula T con la célula presentadora de antígeno, induce polarización del citoesqueleto de la célula T y además contribuye a la transducción de señales de activación. La estimulación simultánea de dos epítomos de CD2 por anticuerpos monoclonales lleva a la proliferación y secreción de citocinas por las células T en ausencia de antígeno y de célula presentadora de antígeno, aunque se piensa que se trata de una vía alternativa de activación del linfocito T. La activación de CD2 y del TcR CD3 comparte una serie de eventos como la activación de Ick, la movilización de calcio, y al fosforilación de los mismos patrones de proteínas. Sin embargo también se han encontrado algunas diferencias entre las dos vías de activación. La implicación de  $\zeta$  y de ZAP-70 en la señal mediada por CD2 es controvertida. Posiblemente CD2 activa vías dependientes e independientes de ZAP-70 y una de estas vías de activación podría converger con la de CD3 en la activación de ZAP-70 o en eventos anteriores (Carmo *et al* 1999, Meinel *et al* 2000).

### 3.- El *Herpesvirus saimiri* como modelo

Los trabajos de laboratorio con linfocitos T presentan el problema de la disponibilidad de muestra. Los linfocitos T primarios tienen una vida limitada y el número de células obtenido no siempre es suficiente para la realización de estudios fenotípicos y funcionales amplios. Este inconveniente es aún mayor cuando se trata de linfocitos extraídos de tejidos. En estos casos la muestra de partida suele ser muy escasa y las técnicas de aislamiento de células son muy dificultosas. Ambos factores contribuyen a que, en muchos casos, el rendimiento no sea suficiente. La obtención de nuevas muestras de pacientes o controles resulta de gran dificultad y no siempre es posible, de manera que el número de pruebas o estudios a realizar se ve afectado. Por ello es conveniente la generación de líneas estables de linfocitos T, que permiten llevar a cabo experimentos y que obvian la limitación en la dificultad de obtener muestras de pacientes.

La inmortalización de linfocitos T con el retrovirus HTLV-1 (*Human T cell Leukemia Virus Type 1*) elimina estos problemas, sin embargo sólo permite la inmortalización de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y además en cultivo pierden la expresión del receptor clonotípico (Inatsuki *et al* 1989, Yssel *et al* 1989).

El *Herpesvirus saimiri* (HVS) es virus linfotrópico miembro de la subfamilia de herpesvirus  $\gamma$ -2. Su hospedador natural es el mono ardilla (*Saimiri sciureus*), al que no causa ningún efecto patogénico. Sin embargo, en otros primates del nuevo mundo, tiene un elevado potencial oncogénico, causando enfermedades linfoproliferativas como linfomas, leucemia y linfosarcoma (Biesinger *et al* 1990). El *Herpesvirus saimiri* puede infectar varios tipos de células, aunque únicamente es capaz de transformar células T (Simmer *et al* 1991).

En 1992, Biesinger y cols. describieron que las cepas del subgrupo C de *Herpesvirus saimiri* son capaces de transformar linfocitos T de sangre periférica y timocitos humanos, y por tanto la infección con HVS puede ser utilizada para generar líneas estables de células T humanas. En los cultivos de células T infectadas no se detecta liberación de partículas virales al medio. El genoma del virus, DNA lineal de doble hebra, persiste exclusivamente en episomas en las células transformadas y sólo se expresa un número limitado de los genes virales (Biesinger *et al* 1992). Una proteína de interacción con tirosina quinasa, Tip (*tyrosine kinase-interacting protein*) se expresa en bajos niveles. Tip se asocia con la proteína lck, que tiene un papel central en la activación de los linfocitos T. En algunos modelos se ha visto que Tip activa fuertemente a lck, sin embargo otros indican que el efecto de Tip sobre lck es inhibitorio (Isakov y Biesinger 2000). La proteína asociada a la transformación de *saimiri* de las cepas del subgrupo C, StpC, (*saimiri transformation-associated protein of subgroup C virus strains*), que se asocia con Ras en la célula, se expresa abundantemente en las líneas de células TcR $\alpha\beta$  y se induce tras activación de las células T. Ambas proteínas son relevantes en la transformación de linfocitos T humanos por el HVS (Fickenscher *et al* 1997). Sin embargo, los mecanismos responsables de la transformación no se conocen completamente, pero se ha demostrado que la transformación no se debe a la resistencia a apoptosis sino a la utilización de las vías de activación normales (Kraft *et al* 1998). Recientemente se ha descrito que el



*Herpesvirus saimiri* es capaz de restaurar la activación a través de CD3 y CD2 en células deficientes de la tirosina quinasa ZAP-70, a pesar de no codificar ninguna proteína homóloga. Esto indica que las proteínas del virus podrían estar interfiriendo en la ruta de activación de las células que infecta (Meinl *et al* 2001).

Este modelo de transformación con HVS presenta varias ventajas sobre la infección con HTLV-1 ya que permite infectar linfocitos tanto CD4 como CD8 y estos mantienen su TcR en superficie tras la infección (Berend *et al* 1993, Meinl *et al* 1995). Además, esta metodología se ha llevado a cabo tanto para la obtención de líneas de linfocitos T de sangre periférica como de tejidos (Martín-Villa *et al* 1998) y ha sido aplicado al estudio de diferentes patologías como el carcinoma gástrico (Valeri *et al* 2003), Ataxia Telangiectasia (Rivero-Carmona *et al* 2000), Inmunodeficiencia Común Variable (Cabanillas *et al* 2002) o SIDA (Saha *et al* 1996).

### 3.1.- Características fenotípicas y funcionales de las líneas celulares T-HVS

La transformación de linfocitos T por la cepa C488 del *Herpesvirus saimiri* da lugar a líneas celulares T CD4<sup>+</sup> o bien CD8<sup>+</sup> (Biesinger *et al* 1992). En algunos casos se han obtenido también células CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> a partir de precursores intratímicos CD34<sup>+</sup> (Pacheco-Castro *et al* 1996). Esta cepa puede infectar tanto células TcR $\alpha\beta$  como TcR $\gamma\delta$  (Fickenscher *et al* 1997, Pacheco-Castro *et al* 1996). La transformación de células T mantiene casi todo el repertorio de regiones V $\beta$  originales (Weber *et al* 1993).

El crecimiento estable de las células T transformadas se basa en la activación mutua a través de la interacción de CD2 con su ligando CD58 y no necesita estimulación antigénica periódica, aunque depende de la adición de IL-2 exógena (Mittrücker *et al* 1992).

Las líneas TcR $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> presentan un fenotipo de células T maduras. Expresan moléculas de superficie características como CD2, CD3, CD5, CD7, CD11a/CD18, CD54 y CD58 y marcadores de activación como CD25, CD26, CD30, CD45RO, CD69, CD80, CD86, CD154 y HLA-DR. Otras moléculas, como CD28 desaparecen de la superficie celular (Weber *et al* 1993). Estas líneas muestran respuestas funcionales (movilización de calcio, síntesis de citocinas, inducción de marcadores de activación, citotoxicidad) normales tanto ante estímulos de membrana como anticuerpos frente al TcR o CD95, o IL-2, como a estímulos transmembranales (acetato de forbol mirístico, PMA) o ionóforos de calcio (Jung *et al* 1998, Rivero-Carmona *et al* 2000). Sin embargo, el modelo también produce algunas alteraciones en las líneas transformadas, como la activación de p53/p59lyn, normalmente inactiva en linfocitos T (Fickenscher *et al* 1997), y la desviación de la producción de citocinas hacia una respuesta Th1 (De Carli *et al* 1993).

En el presente trabajo se ha optado por utilizar el modelo de transformación con el *Herpesvirus saimiri*.

## 4.- Células dendríticas

Las células dendríticas (DC) son las células presentadoras de antígeno más competentes ya que son las únicas células que pueden activar linfocitos T vírgenes y conseguir una respuesta inmunológica primaria. Proceden de precursores de médula ósea y están distribuidas por órganos linfoides y no linfoides (Iwasaki y Kelsall 1999). No existen marcadores de superficie específicos de linaje que se expresen en todas las células dendríticas. Los criterios que definen un leucocito como célula dendrítica son la morfología dendrítica, una alta expresión de moléculas MHC y moléculas coestimuladoras, la presencia de vías endocíticas de captura y procesamiento de antígeno, y especialmente la potente capacidad de estimular linfocitos T no activados. Sin embargo, estas características sólo coinciden en células dendríticas totalmente activadas, no en las inmaduras o en los precursores. Las células dendríticas son una población heterogénea, ya que se han encontrado características fenotípicas y funcionales distintas entre subpoblaciones de células dendríticas de distintas localizaciones (Grabbe *et al* 2000). Teniendo en cuenta todo esto, desde el año 2000 en el 6<sup>th</sup> *International Symposium of Dendritic Cells* (Port Douglas, Australia, 26 May-1Jun 2000) se ha aceptado que las células dendríticas pueden proceder de distintos tipos de células progenitoras, que se pueden generar distintos tipos funcionales de células dendríticas a partir del mismo precursor y que existen distintos tipos de células dendríticas en la sangre de humanos o en el bazo de ratón *in vivo* (Grabbe *et al* 2000).

Las células dendríticas residentes en los tejidos, en su estado inmaduro, son eficientes en fagocitosis de antígeno. Cuando sufren estimulación microbiana, las DC cargadas de antígeno migran a los nódulos linfáticos. Después de la exposición, las células dendríticas que están madurando producen quimiocinas, citocinas e IFN- $\alpha/\beta$ , indicando un papel de las células dendríticas en el reclutamiento y amplificación de la respuesta inmunológica innata. En el camino procesan los antígenos y presentan los péptidos fragmentados en MHC de superficie. Las células dendríticas también sufren maduración funcional que implica la translocación de moléculas MHC-II desde compartimentos intracelulares hacia la superficie celular y la biosíntesis *de novo* de moléculas MHC-I. Las células dendríticas maduras expresan altos niveles de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86) y de adhesión que favorecen la activación de las células T y aumentan la expresión de receptores de citocinas particulares, como CCR7, que se cree que dirigen la migración a órganos linfoides (Rescigno *et al* 1999).

En humanos, basándose en la expresión de la molécula de adhesión CD11c, se han descrito dos subtipos principales de células dendríticas en sangre periférica. Las células dendríticas CD11c<sup>+</sup> expresan antígenos característicos de células mieloides, son inmunoestimuladoras y tienen gran capacidad de captura de antígenos. Las DC CD11c<sup>-</sup> poseen morfología linfoide, carecen de antígenos mieloides, y expresan altos niveles de CD123 (IL-3R) (Olweus *et al* 1997) y el marcador BDCA-2 (*Blood dendritic cell antigen*), una lectina tipo II C, que podría jugar un papel en la internalización y presentación de ligandos (Dzionek *et al* 2001). Las primeras se consideraron de

origen posiblemente mieloide, mientras que las segundas, DC plasmacitoides, podrían ser de origen linfoide (Robinson *et al* 1999). Sin embargo, analizando la expresión de otros marcadores como CD1c, CD16, BDCA-3 o CD34 estos grupos se pueden fraccionar hasta llegar a cinco subtipos distintos (MacDonald *et al* 2002).

**Tabla 1.- Subtipos principales de células dendríticas en humanos según la expresión de distintos marcadores de membrana.**

DC MIELOIDES	DC LINFOIDES / PLASMACITOIDES
CD11c +	CD11c –
CD11b +	CD11b –
CD123 –	CD123 +
BDCA-2 –	BDCA-2 +
CD4 +/-	CD4 +
CD45RA –	CD45RA +
CD1c +	CD1c –

El origen de las células dendríticas es controvertido. Debido a ciertas similitudes con monocitos/macrófagos en cuanto a distribución, morfología, fenotipo y actividad enzimática, se consideró que las células dendríticas eran de origen mieloide. Estudios posteriores han demostrado que se pueden generar distintos tipos de células dendríticas a partir de progenitores de varios linajes leucocitarios, conocidos como células dendríticas linfoides y células dendríticas mieloides.

En ratón, progenitores que expresan un porcentaje de CD4 bajo, y que dan lugar a células B, T y NK, son capaces de reconstituir la población de células dendríticas CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>. Esto llevó a considerar a esta subpoblación de origen linfoide, y la subpoblación CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>, de origen mieloide. Sin embargo, se ha conseguido generar *in vitro* células dendríticas CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> y CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> a partir del mismo progenitor “CD4 bajo”, y ambas subpoblaciones pueden proceder tanto de un linaje linfoide como mieloide. En humanos se consigue diferenciar células dendríticas a partir de monocitos CD14<sup>+</sup> si se cultivan con GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) e IL-4. Asimismo, células dendríticas inmaduras en presencia de M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) se diferencian a macrófagos. Por tanto, estas células CD11c<sup>+</sup>, se consideran de origen mieloide (Pulendran *et al* 2001). Otro tipo de células dendríticas descritas en humanos, las células dendríticas plasmacitoides, constituyen una población CD11c<sup>-</sup> inmadura, CD123<sup>+</sup> (IL-3R $\alpha$ ), con alta capacidad de secreción de IFN tipo I después de una infección viral. Se consideran de origen linfoide porque dependen de IL-3 y no de GM-CSF y debido a la expresión de la cadena pre-T $\alpha$ . Por otro lado, también se ha propuesto un origen mieloide de las células dendríticas plasmacitoides, ya que algunas se han podido

desarrollar a partir de células CD123<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> M-CSFR<sup>+</sup> (*macrophage colony-stimulating factor receptor*) (Ardavín *et al* 2001).

Hasta el momento, se proponen dos modelos alternativos de diferenciación de células dendríticas. Uno considera la existencia de dos vías de diferenciación independientes (Robinson *et al* 1999); una principal, mieloide, que da lugar a las células dendríticas de órganos linfoides y a las células de Langerhans de la piel, y una secundaria que generaría las células dendríticas linfoides, que podrían incluir las células dendríticas intersticiales del timo y las plasmacitoides. El segundo modelo, se basa en datos de Ardavín y cols., y propone una vía de diferenciación común que generaría la mayoría de las subpoblaciones de células dendríticas, excepto las que derivan de monocitos y las células dendríticas plasmacitoides (Ardavín *et al* 2001). Estudios recientes con precursores de células dendríticas de ratón apoyan la idea de que las células dendríticas se generan a partir de una contribución dual de precursores de DC, que derivan tanto de vías de diferenciación linfoides como mieloides (Ardavín 2003).

Poco se conoce sobre la presencia de estos distintos subtipos de células dendríticas *in vivo* y sobre si tienen propiedades individuales distintas, especialmente en humanos. Sobre este último punto surgen dos puntos de vista fundamentales. Algunos autores defienden la hipótesis de que distintos tipos de células dendríticas llevan a cabo un papel inmunorregulador diferente, mientras que otros creen que la diferencia de función se debe al estado de activación o de maduración de la célula dendrítica y no de su origen o subtipo.

En humanos existen evidencias que apoyan que las células dendríticas mieloides inducen una respuesta Th1 (DC1) y las células dendríticas linfoides/plasmacitoides una respuesta Th2 (DC2) (Rissoan *et al* 1999). Un estudio de Ito y cols. demuestra que la activación del receptor TLR-7 por su ligando, en células dendríticas aisladas de sangre humana, lleva a la expresión de IFN- $\alpha$  por el linaje plasmacitoide y de IL-12 por el linaje mieloide. Estos resultados indican que el tipo de respuesta de las células dendríticas es específico de linaje (Ito *et al* 2002). En ratón se ha encontrado lo contrario, DC mieloides generan Th2 y DC linfoides Th1, pero también que DC mieloides pueden inducir respuesta Th1 (Maldonado-López *et al* 1999, Vieira *et al* 2000). De modo que el concepto de “un tipo celular – un tipo de respuesta” se está poniendo en duda.

Otros resultados indican que, según las condiciones de cultivo y las señales de activación, las células dendríticas pueden adquirir la capacidad de inducir respuesta Th1, Th2 o TH0/Tr1. DC2 derivadas de precursores de sangre CD123<sup>+</sup> CD11c<sup>-</sup>, en presencia de IL-3 y CD40L pueden generar respuestas Th2, o tras la exposición a IFN- $\alpha$  y TNF- $\alpha$ , inducir la producción de IL-10 e IFN- $\gamma$  por las células T (Liu 2001), y la estimulación de células dendríticas plasmacitoides con oligonucleótidos que contienen motivos CpG imitando el DNA bacteriano (CpGODN)<sup>+</sup> CD40L induce la producción de altos niveles de IL-12 (Krug A 2001). De manera que, tanto el tipo de célula dendrítica como los factores ambientales pueden ser importantes para la polarización de la respuesta Th.

Una última hipótesis es que el estado de maduración de la célula dendrítica es lo que determina el tipo de respuesta celular T generada. Además, varios subtipos celulares se diferencian en su capacidad de alcanzar el estado de maduración completa que se requiere para la inducción de la respuesta Th1. Lanzavecchia propone que la inducción de esta respuesta se debe a la producción de IL-12 por parte de la célula dendrítica y esto sólo ocurre durante un breve intervalo de tiempo después de la activación. A periodos de tiempo mayores, las células dendríticas sólo podrían estimular respuestas Th2 o células T de memoria. Las células dendríticas inmaduras podrían generar tolerancia debido a la activación de células T abortivas (Grabbe *et al* 2000).

Además de promover la inmunidad, las células dendríticas también median en la tolerancia periférica de las células T por eliminación directa, a través de la inducción de células T reguladoras y, por otro lado, también pueden inducir una respuesta autoinmune. Las células dendríticas en las lesiones autoinmunes exhiben un fenotipo maduro alterado, y las obtenidas de sangre presentan defectos en el desarrollo o un fenotipo inmaduro alterado. Sin embargo, no está claro si estas alteraciones son causas o efectos de la enfermedad autoinmune (Turley 2002).

Estudios en ratón y rata demuestran que las células dendríticas están presentes en el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal como en las Placas de Peyer, y esparcidas por la *lamina propria*, y también una población puede estar localizada en el propio epitelio (Bell *et al* 2000).

Las distintas subpoblaciones de DC presentes en sangre probablemente se encuentran en camino hacia diferentes tejidos. Las células dendríticas mieloides CD11c<sup>+</sup> y las plasmacitoides CD123<sup>+</sup>, migran a través del endotelio de forma diferente, tanto de forma espontánea como en respuesta a diferentes estímulos quimiotácticos *in vitro* (De la Rosa *et al* 2003).

Varios autores proponen que, en la mucosa intestinal, las células dendríticas del domo subepitelial de las placas de Peyer, capturan antígenos intestinales transportados por las células M y migran hacia las regiones T (Iwasaki y Kelsall 2001, Shreedar *et al* 2003). Según Rescigno y cols. las células dendríticas podrían capturar los antígenos directamente del *lumen* intestinal (Rescigno *et al* 2001). Si el antígeno encontrado no es infeccioso, la célula dendrítica generaría una respuesta Th2, Th3 o Tr1, caracterizadas por la producción de IL-10 o TGF- $\beta$ , y bajos niveles de IL-12 (DC2). Si se encuentra con un estímulo nocivo (LPS, ADNds), o si la dosis de antígeno es muy elevada, se produciría la maduración convencional de la célula dendrítica, que llevaría a la secreción de altos niveles de IL-12, lo cual induciría a las células T a secretar IFN- $\gamma$ , resultando en una respuesta Th1 (DC1) (Iwasaki y Kelsall 1999).

Shortman y cols. proponen que en individuos no infectados, especialmente en las condiciones de los ratones de laboratorio, algunas células dendríticas podrían desarrollarse hacia un estado maduro pero quiescente, debido a la presencia de factores endógenos incluidas las citocinas. Estas células maduras quiescentes, serían distintas de las DC1 y las DC2 y mediarían en la respuesta de autotolerancia (Shortman y Liu 2002).

#### 4.1- Las células dendríticas en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal

Varios trabajos (anteriormente citados) demuestran que las células dendríticas del tracto intestinal juegan un papel importante en la iniciación y la regulación de la respuesta inmunológica de la mucosa. Por tanto, su alteración puede contribuir a la disregulación de la respuesta inmunológica subyacente a la Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

En el modelo de colitis inducida por transferencia de células T CD4 vírgenes a ratones inmunodeficientes (RAG1<sup>-/-</sup>, o Balb/c H-2<sup>d</sup>), se ha visto que estas células T causantes del desarrollo de colitis se agrupaban y proliferaban en agregados de células dendríticas en la *lamina propria* del colon. Estos agregados de células T y células dendríticas precedían las manifestaciones histológicas de la colitis en el tejido, sugiriendo que se trata de un elemento clave en el desencadenamiento de dichas alteraciones (Leithäuser 2001, Shortman y Liu 2002). Becker y cols demuestran que existe una formación aumentada de IL-23, citocina inductora de la respuesta Th1, por las células dendríticas CD11c<sup>+</sup> CD8α<sup>-</sup> de *lamina propria* de ratón. Este aumento se produce debido a que la flora bacteriana activa la transcripción de la subunidad p40 de la IL-23 (también parte de la IL-12) por NF-κB. La producción de IL-23 se restringe al íleon terminal y no al resto del intestino, lo que indica un estado de activación de las células dendríticas de esta localización, que podría estar implicada en la manifestación clínica preferente de la Enfermedad de Crohn en esta parte del intestino. El hecho de que la activación resulte en aumento de la producción de IL-23 y no de IL-12, sugiere que esta citocina podría ser un mediador importante en la inflamación intestinal (Becker *et al* 2003, Uhlig y Powrie 2003). Otros estudios demuestran que en la EC está aumentada la producción de IL-12 y de IL-18 por células dendríticas del colon que expresan el marcador de superficie DC-SIGN (*DC specific ICAM-3 grabbing non-integrin*) pero no CD83, marcador de células dendríticas maduras. Aunque el número de ambas subpoblaciones de DC estaba aumentado en el colon de pacientes con EC comparado con tejidos normales (Te Velde *et al* 2003).

Las células dendríticas son capaces de determinar si se produce o no respuesta frente a un antígeno, en parte induciendo células T reguladoras. Además, pueden inducir el tipo de respuesta que se desarrolla, por ejemplo mediante la producción de citocinas. Un estudio de Stagg y cols sugiere que, además, las células dendríticas pueden modelar la respuesta inmunológica influenciando los patrones de migración de las células T que activan. Estos autores encuentran un aumento de la expresión de la integrina α4β7 en células T activadas con células dendríticas de nódulos linfáticos mesentéricos, comparado con la activación por células dendríticas de nódulos linfáticos periféricos. De esta forma, las células dendríticas influirían en el desarrollo de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal, ya que se han encontrado niveles alterados de α4β7 en los linfocitos T de pacientes con esta patología (Bell *et al* 2000, Meenan *et al* 1997). Otras moléculas coestimuladoras como CD40 o CD86 está aumentadas en las células dendríticas de sangre periférica de pacientes con EC y CU (Vuckovic *et al* 2001).

## 5.- Sistema Inmunológico de mucosas

La mayoría de los antígenos que encuentra el Sistema Inmunológico a la largo de la vida, entran en el organismo a través de la superficie mucosa del tracto respiratorio, gastrointestinal o urogenital. Estas superficies constituyen, en el adulto, unos 400m<sup>2</sup> de superficie, siendo la mayor zona del organismo en contacto con el medio externo (Brandtzaeg 2001, Neutra *et al* 1996).

Las superficies mucosas separan el medio externo del interior estéril del organismo, y así representan una primera línea de defensa (Basset 2003). Esta barrera se encuentra con patógenos que han desarrollado mecanismos para colonizar las superficies epiteliales e invadir los tejidos, pero también con elementos no dañinos como la comida o la flora bacteriana comensal. Estos últimos requieren una respuesta adecuada de ignorancia o de supresión activa. Los primeros, en cambio, necesitan una fuerte respuesta inmunológica.

Bajo estas influencias, en las mucosas se ha desarrollado un Sistema Inmunológico complejo, anatómica y funcionalmente distinto del Sistema Inmunológico sistémico, que es capaz de producir una respuesta inmunológica frente a los antígenos patogénicos y no frente a las sustancias inofensivas.

El Sistema Inmunológico de mucosas está compuesto por los tejidos linfoides asociados con las superficies mucosas (MALT- *mucosal associated lymphoid tissue*), y se puede separar en varios componentes: tejido linfoide asociado al intestino (GALT- *gut associated lymphoid tissue*), asociado al tejido bronquial (BALT), al nasofaríngeo (NALT), a las glándulas mamarias y salivales, y a los órganos genitourinarios (Kelsall y Strober 1996).

Se estima que el intestino contiene el 70-80% del total de las células linfoides del organismo y produce más anticuerpos que cualquier otro órgano en el cuerpo (McGhee *et al* 1992). Sin embargo, las células inmunológicas no son las únicas que previenen la infección en las superficies mucosas. Son importantes varios mecanismos físicos, considerados parte del Sistema Inmunológico innato por algunos autores. Estos incluyen la barrera epitelial y las defensas extraepiteliales que los patógenos tienen que eludir para alcanzar el acceso al epitelio y a los tejidos internos. En primer lugar, las fuerzas de lavado y la acción ciliar crean una corriente que elimina los patógenos no unidos al epitelio. La capa de *mucus* secretada por las células caliciformes impide la unión de los microorganismos. Otros mecanismos inhiben su crecimiento como el pH ácido del estómago, enzimas (lisozima, lactoferrina, lactoperoxidasa) o péptidos antimicrobianos secretados por las células epiteliales como defensinas, catelicidinas e histatinas. La flora comensal proporciona resistencia a la colonización ocupando posibles lugares de unión, compitiendo por los nutrientes o secretando compuestos inhibitorios como bacteriocinas o productos metabólicos. También se incluyen en las defensas epiteliales las inmunoglobulinas secretadas IgA e IgM de especificidad limitada, las moléculas de reconocimiento de patrones solubles como lectina de unión a manosa (MBL, *mannose binding lectin*), componentes del sistema del complemento, proteína C reactiva,

proteína de unión a lipopolisacárido y CD14 (que también puede encontrarse unido a la membrana) y las citocinas y quimiocinas del Sistema Inmunológico (Basset 2003, Kelsall y Strober 1996).

La barrera epitelial constituye otro elemento mecánico en la defensa frente a patógenos. Posee defensas celulares y químicas. Las células que componen la mucosa intestinal forman una única capa y son un sistema en continua renovación a partir de células madre pluripotentes localizadas cerca de la base de las criptas de Lieberkühn. La progenie de estas células sufre diferenciación hacia uno de cuatro linajes mientras migra hacia la superficie de las criptas (enterocitos, células caliciformes o células entero-endocrinas) o hacia de la base de la cripta (células de Paneth) (Dwinell y Johanesen 2003). Las células epiteliales intestinales forman una barrera altamente selectiva. El flujo transcelular y paracelular están controlados estrechamente por bombas de membrana, canales iónicos y uniones estrechas (tight junctions ,TJ) que adaptan la permeabilidad a las necesidades fisiológicas.

Además de la función protectora mecánica, el epitelio provee al Sistema Inmunológico de un continuo flujo de información acerca del medio externo. Un funcionamiento correcto del MALT requiere un transporte de moléculas y antígenos a través de la barrera epitelial y el establecimiento de colaboración entre las células epiteliales, las células presentadoras de antígeno y las células linfoides (Martín-Villa y Rodríguez-Juan 2003). La tolerancia frente a los microorganismos comensales y la inmunidad frente a patógenos requiere un reconocimiento, captura de antígenos, procesamiento y mecanismos de respuesta intactos (Baumgart y Dignass 2002).

## **5.1- Organización del MALT**

Los elementos linfoides de la mucosa pueden ser divididos morfológica y funcionalmente en dos partes principales: el tejido linfoide organizado, formado por los folículos de la mucosa, responsable de la fase de inducción de la respuesta inmunológica; y el tejido linfoide difuso, que consiste en linfocitos dispersos por el epitelio y la *lamina propria* de la mucosa, y constituye el sitio de la respuesta inmunológica efectora (Mowat 2003, Neutra *et al* 1996).

### **5.1.1.- Tejido linfoide organizado**

A lo largo del tracto gastrointestinal existen folículos simples con frecuencia creciente en el colon y el recto. La agregación de folículos se da en las Placas de Peyer del intestino delgado y en el apéndice.

#### **5.1.1.1.- Placas de Peyer**

Las placas de Peyer son agregados linfáticos macroscópicos que se encuentran en la submucosa a lo largo de todo el intestino delgado. Las Placas de Peyer maduras consisten en la acumulación de grandes folículos de células B y áreas intermedias de células T. Las células B



virgenes del centro germinal del folículo están sostenidas o conectadas por células dendríticas foliculares (FDC). Estas FDC no derivan de médula ósea y son diferentes de las células dendríticas que presentan antígenos a las células T vírgenes (Janeway *et al* 2000). Cada folículo está rodeado por una zona parafolicular rica en células T, donde existe gran cantidad de vénulas de endotelio alto (HEV) que permiten la migración celular y la recirculación linfoide. Las placas de Peyer se diferencian del resto de los nódulos linfáticos en que no tienen vasos linfáticos aferentes. Esta característica se corresponde con el hecho de que el antígeno se toma del *lumen* intestinal a través del epitelio (Croitoru y Bienenstock 1994).

Las zonas linfoides de las placas de Peyer están separadas del *lumen* intestinal por una única capa de células epiteliales columnares, conocido como epitelio asociado al folículo (FAE, *follicle associated epithelium*). Inmediatamente por debajo del epitelio se encuentra una zona más difusa, conocida como domo subepitelial (SED, *subepithelial dome*). El FAE se diferencia del epitelio que cubre la mucosa en que contiene niveles más bajos de enzimas digestivas, un borde en cepillo mucho menos pronunciado y una ausencia total del receptor para IgA polimérica. Está infiltrado por gran número de células B, T, macrófagos y células dendríticas. La característica más notable del FAE es la presencia de células M (*microfold*). Estas son enterocitos especializados con borde en cepillo poco desarrollado y una fina capa de glicocalix, de manera que están adaptadas a una función de captura de antígenos. Las células M se diferencian a partir de enterocitos bajo la influencia de linfotoxina  $\alpha_1\beta_2$  ( $LT\alpha_1\beta_2$ ) unida a membrana presente en células linfoides locales, principalmente linfocitos B (Mowat 2003).

Para algunos autores una Placa de Peyer, por definición, está compuesta por cinco o más folículos de células B (Brandtzaeg 1999), pero otros autores consideran un único folículo como Placa de Peyer si está presente el FAE (MacDonald y Spencer 1994).

#### **5.1.1.2.- Nódulos linfáticos mesentéricos**

Los nódulos linfáticos mesentéricos (MLN) son los nódulos linfáticos más grandes del cuerpo. Su desarrollo es distinto del de las placas de Peyer y de los nódulos linfáticos periféricos, ya que está relativamente poco afectado por la ausencia de la mayoría de los factores implicados en la ontogenia de estos otros órganos (TNF, TNFR,  $LT\alpha_1\beta_2$  y LTBR). Estos factores pueden tener funciones complementarias en el desarrollo de los MLN. La acumulación de linfocitos en los MLN requiere L-selectina e integrina  $\alpha_4\beta_7$ , moléculas de adhesión que normalmente están implicadas en la migración de los linfocitos a tejidos periféricos y a mucosa respectivamente. Debido a estas características, se puede considerar a los MLN como un cruce entre las vías de recirculación periférica y de mucosas (Mowat 2003).

El primer paso en la inducción de una respuesta inmunológica de mucosas es el transporte de antígenos a través de la barrera epitelial. Después del procesamiento y presentación de antígenos en los sitios de inducción, los linfoblastos B específicos de antígeno proliferan localmente y migran vía sanguínea hacia tejidos secretores y mucosas locales y distantes. La IgA, dimérica o polimérica,

es transportada a través de las células epiteliales en secreciones glandulares y mucosas vía transcitosis mediada por receptor (Apodaca *et al* 1991).

### 5.1.2.- Tejido linfoide difuso

Los elementos linfoides menos organizados asociados con la mucosa intestinal, incluyen tanto los linfocitos intraepiteliales (LIE) como los linfocitos de *lamina propria* (LLP).

#### 5.1.2.1- Linfocitos de *lamina propria*

La *lamina propria* es la capa de tejido conjuntivo existente entre el epitelio y la *muscularis mucosa*. Esta capa está constituida por células de músculo liso, fibroblastos, vasos sanguíneos y vasos linfáticos (MacDonald y Spencer 1994).

La *lamina propria* del intestino delgado y del intestino grueso humano está infiltrada por células linfoides y mieloides. Se encuentran células T, células B, macrófagos, células dendríticas, granulocitos y mastocitos (Kelsall y Strober 1996). El elevado número de macrófagos, células dendríticas y células T en la *lamina propria* hacen probable que los antígenos que cruzan el epitelio puedan ser procesados y presentados a las células T CD4<sup>+</sup> allí presentes.

Las células plasmáticas-IgA<sup>+</sup> son un 30-40% de las células mononucleares de la *lamina propria* humana y las células B vírgenes un 15-45%. En el intestino normal cerca del 80% de las células plasmáticas secretan IgA, aunque también se encuentra un pequeño número de células plasmáticas secretoras de IgM e IgG. Al contrario que las células plasmáticas, la mayoría de las células B no plasmáticas son sIgM<sup>+</sup> sIgD<sup>+</sup> en la *lamina propria* de ratón.

Las células T de la *lamina propria* son principalmente CD4<sup>+</sup> (60-70%) y la gran mayoría expresa TcR $\alpha\beta$  (95%). Cerca de un 10% de ellas son CD25<sup>+</sup> y la mayoría expresa CD45RO, lo que indica un fenotipo de memoria. Las células TCD4<sup>+</sup> de la *lamina propria* son de particular importancia para la regulación de la respuesta inmunológica local. Generalmente son insensibles a señales de proliferación mediadas por el TcR, pero, en humanos, se puede inducir su proliferación si se utiliza CD2 como molécula coestimuladora. Estas células producen gran cantidad de citocinas, particularmente IFN- $\gamma$ , pero también IL-4 e IL-10. Las células T CD8 de la *lamina propria* pueden tener una actividad citolítica potente. Algunas células T de *lamina propria* de memoria pueden ser verdaderas células efectoras y pueden ayudar a las células B locales a producir IgA. Por otra parte pueden ser células de memoria efectoras. Finalmente las células T de *lamina propria* pueden ser células T reguladoras y así ser responsables del mantenimiento de la tolerancia local a los antígenos ambientales (MacDonald y Spencer 1994).

### 5.1.2.2- Linfocitos intraepiteliales

El número medio de linfocitos intraepiteliales en el yeyuno humano adulto es de 20 por cada 100 células absortivas y desciende distalmente en el intestino. Estas células están localizadas sobre la lamina basal en el epitelio y están separadas de los enterocitos adyacentes por un espacio de 10 a 20 nm. Estos contactos entre los linfocitos y las células epiteliales no tienen estructura de uniones estrechas (Cebra y Shroff 1994).

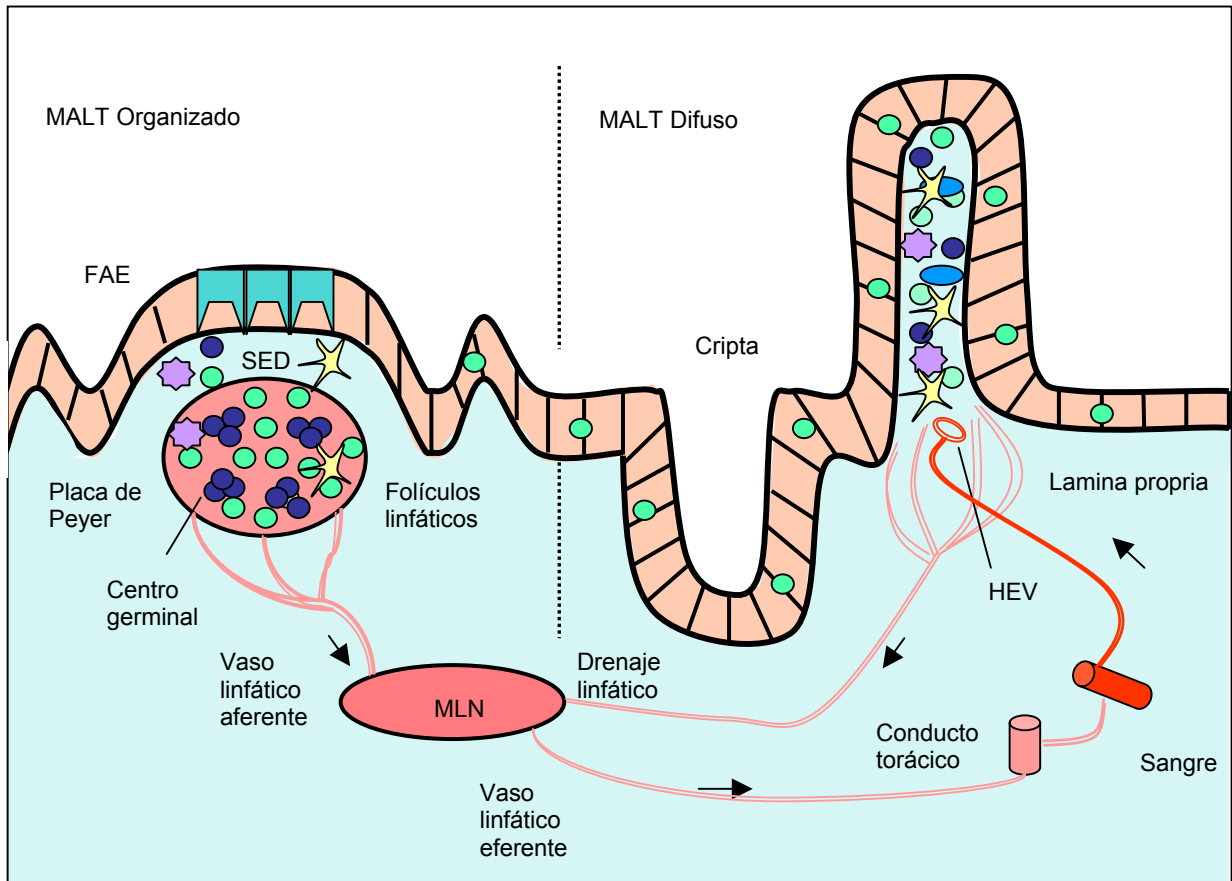
Las células intraepiteliales son una población funcionalmente heterogénea que contiene células con actividad antitumoral, actividad natural killer, linfocitos T citotóxicos aloespecíficos (CTL), precursores de CTL y mastocitos (Tomasi 1994). Casi todos los LIEs son CD3<sup>+</sup>. Entre estos, sólo 5-15% expresan fenotipo CD4<sup>+</sup> (cooperadores o inductores) y el resto expresan CD8 (citotóxicos o supresores). Una gran fracción de éstos expresa un homodímero CD8 $\alpha\alpha$ , esencialmente ausente de la circulación. De las pocas células CD4<sup>+</sup> presentes en el epitelio, muchas expresan también CD8 $\alpha\alpha$ . Estas células dobles positivas tampoco se encuentran en la circulación sistémica. Más del 10% de los LIEs son células CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, dobles negativas, en el epitelio del intestino delgado de ratón, y constituyen la mayoría de los LIEs de otros compartimentos (Hayday *et al* 2001).

Aunque los receptores de las células T que median reconocimiento antigénico están compuestos predominantemente por cadenas  $\alpha\beta$ , en el epitelio intestinal la proporción de linfocitos T  $\gamma\delta$  es mucho mayor que en sangre periférica o en la *lamina propria*. Por tanto se piensa que los linfocitos TcR $\gamma\delta$  tienen un papel especial. El microambiente del epitelio intestinal puede influir en la diferenciación de los LIEs. Las funciones de los LIEs no están claras, sin embargo, pueden participar en citotoxicidad, secreción de citocinas, regulación de la renovación del epitelio de las mucosas y tolerancia.

Varios grupos han demostrado la presencia de LIEs CD3<sup>-</sup>CD7<sup>+</sup> (Eiras *et al* 2000, Howie *et al* 1998). Esta subpoblación representa una proporción sustancial (42% $\pm$ 20) del total de los LIEs de biopsias de intestino delgado de niños. Dentro de esta población, sólo el 10% expresa CD8 $\alpha\alpha$ . Fenotípicamente se parecen a células NK y se han llamado linfocitos intraepiteliales NK-like. La mayoría de ellos expresan CD161, cerca del 44% expresa CD56 y solamente el 12% expresa CD16, en contraste con la expresión de CD56 y CD16 en las células NK clásicas de sangre periférica, pero semejando el fenotipo de células NK aisladas de la decidua (Eiras *et al* 2000). Esta población contiene gránulos intracitoplásmicos de perforina y posee potencial lítico, lo que muestra la existencia de células con función NK en el epitelio intestinal (Eiras *et al* 2000, León *et al* 2003).

Casi todos los LIEs, sea cual sea su fenotipo de superficie expresa la integrina  $\alpha_E\beta_7$  (CD103), cuyo ligando es la E-cadherina epitelial. Las interacciones entre  $\alpha_E\beta_7$  y E-cadherina pueden ayudar a anclar los LIEs al epitelio y pueden desempeñar también un papel funcional (Farstad *et al* 1996, MacDonald 2003)

Figura 1.- Representación esquemática del tejido linfoide asociado a mucosa (MALT) difuso y organizado en el epitelio intestinal.



El tejido organizado representa lugares de inducción de la respuesta inmunológica mientras que el tejido difuso, donde llegan las células activadas tras pasar del drenaje linfático a la circulación sanguínea y, finalmente a la *lamina propria* vía vasos sanguíneos, representa lugares inductores.

● Linfocito T, ● Linfocito B, ● Célula plasmática, ● Macrófago, ● Célula dendrítica, ● Célula epitelial, ● Célula M, SED domo subepitelial, MLN nódulo linfático mesentérico, HEV vénulas de endotelio alto.

## 5.2.- Encuentro inicial de antígenos en la mucosa

### 5.2.1.- Células M en la captura de antígenos

En el epitelio intestinal simple, cuyos espacios intercelulares están sellados por uniones estrechas, los antígenos son capturados preferentemente en las zonas especializadas del epitelio asociado al folículo. Las células M entregan las muestras del material extraño por transporte transepitelial desde el *lumen* a los tejidos linfoides de la mucosa (Neutra *et al* 1996). La membrana basolateral de las células M está invaginada y forma un “bolsillo” intraepitelial en el que se liberan los antígenos. Poblaciones específicas de linfocitos migran al “bolsillo” y se asocian con la membrana de las células M. Se han identificado células T y B, junto con un pequeño número de macrófagos. La mayoría de las células T eran CD4<sup>+</sup>, ninguna TcR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, y la mayoría expresaba el marcador de activación CD69, típico de células de memoria, aunque en algunas especies se han observado también células T vírgenes. Las células B del “bolsillo” expresan HLA-DR, lo que sugiere que esta región es un sitio de interacción de células T con células B presentadoras de antígeno. Esta interacción podría llevar a la secreción de IL-2 y a la proliferación de las células T, o si se trata de un linfocito T sin las moléculas coestimuladoras necesarias, una respuesta posible sería la inducción de anergia y por tanto tolerancia (Brandtzaeg *et al* 1999, Brandtzaeg 2001). Bajo el epitelio existe una amplia red de macrófagos y células dendríticas mezcladas con linfocitos T CD4 y linfocitos B del folículo. Desde esta localización las células presentadoras de antígeno se desplazan a las zonas T o B de los folículos, donde pueden interactuar con linfocitos vírgenes. Probablemente las células dendríticas son las implicadas en este proceso. En el folículo, las células B sufren cambio de isotipo hacia IgA, bajo la influencia de varios factores locales, como TGF- $\beta$ , IL-10, y señales celulares procedentes de linfocitos T y células dendríticas.

Los linfocitos activados en las placas de Peyer salen a través de los vasos linfáticos de drenaje, hacia los nódulos linfáticos mesentéricos, donde residen por un periodo de tiempo indefinido de diferenciación antes de migrar al torrente sanguíneo a través del conducto torácico y finalmente acumularse de nuevo en la mucosa. Los linfocitos que son activados en el GALT, pierden la expresión de L-selectina y aumentan la expresión de  $\alpha_4\beta_7$ , cuyo ligando, molécula de adhesión celular adresina de mucosa 1 (MAdCAM-1), se expresa en altos niveles en la vasculatura de mucosas (Mowat 2003).

### 5.2.2.- Células dendríticas en la captura de antígenos

Las células presentadoras de antígeno, como los macrófagos o las células dendríticas se encuentran inmediatamente bajo las células M, con la localización adecuada para captar muestras de los antígenos transportados y, posteriormente, presentarlos en los folículos linfáticos. Sin embargo, estas localizaciones son relativamente escasas a lo largo del intestino y probablemente no son suficientes para que se presente una muestra representativa de los antígenos del *lumen*

intestinal a los linfocitos. Rescigno y cols. describen un nuevo mecanismo independiente de células M, que permite que las células dendríticas tomen directamente antígenos del medio, sin afectar a la función de la barrera epitelial, y los entreguen en los tejidos linfoides. Su estudio muestra que las células dendríticas extienden procesos a través de las uniones estrechas de los enterocitos preservando la integridad de la barrera epitelial. Los autores proponen que las células dendríticas son capaces de formar uniones estrechas con las células epiteliales intestinales, ya que expresan proteínas de uniones estrechas.

La capacidad de migración de las células dendríticas les permitiría transportar los patógenos hasta los nódulos linfáticos mesentéricos y el bazo, para la inducción de respuestas sistémicas, lo que implica que esta es una vía alternativa de internalización bacteriana que tiene alta importancia fisiológica. Esto sugiere la implicación de las células dendríticas en la inducción de IgA directa frente a las bacterias comensales en la *lamina propria* y podría estar implicado en el transporte de células epiteliales intestinales apoptóticas a las zonas T de los nódulos linfáticos mesentéricos, sin perturbar la integridad de la barrera epitelial (Gewirtz y Madara 2001, Rescigno *et al* 2001, Rescigno 2003).

### **5.2.3.- Células epiteliales en la captura de antígenos**

La gran mayoría de la superficie de las mucosas está compuesta por el epitelio absortivo intestinal, que es el mayor lugar de encuentro con antígenos. La disponibilidad de antígenos a través de esta barrera celular está regulada por mediadores solubles como citocinas y toxinas que aumentan la permeabilidad (IL-4, IL-13, TNF, IFN- $\gamma$ ) y citocinas que promueven la formación de la barrera (TGF- $\beta$ , IL-15). La permeabilidad paracelular es un mecanismo indiscriminado de entrada de antígenos, que los libera directamente en la superficie basolateral de las células epiteliales a células presentadoras como macrófagos y células dendríticas. Los mecanismos transcelulares son más importantes, bien mediados o no mediados por receptor. Los primeros sirven para transportar antígenos intactos y los segundos son predominantemente degradativos, con un porcentaje muy bajo de antígenos que traspasan la célula intactos, aunque, debido a la enorme superficie del intestino, son relevantes biológicamente. Ambos procesos tienen la capacidad de llevar macromoléculas en compartimentos endolisomales. Asociados con la presentación antigénica por moléculas MHC de clase II (Blumberg *et al* 1999).

Numerosos trabajos describen la presencia de niveles bajos de antígenos HLA de clase II en la superficie de células epiteliales normales y han demostrado aumento de la expresión de estas moléculas en condiciones patológicas como Enfermedad Inflamatoria Intestinal, enfermedad de injerto contra huésped o enfermedad celiaca. Estas observaciones sugieren que el epitelio intestinal puede funcionar en la inmigración de antígenos y o en la regulación de la respuesta de las células T CD4 en la mucosa. Varios grupos han descrito la presentación de antígeno por parte de las células epiteliales en humanos (Mayer y Shlien 1987), rata (Bland y Warren 1986) y ratón (Kaiserlian 1989). Heishberg y cols. describen dos vías distintas para el procesamiento de antígenos por células epiteliales, que distingue entre estados de activación y de no activación. Una de las vías es similar al

procesamiento de antígenos convencional y utiliza proteasas similares, la cadena invariante (Ii) y HLA-DM $\alpha\beta$ . Esta vía ocurre en presencia de IFN- $\gamma$  y facilita presentación de antígenos incluso a concentraciones de antígeno bajas. La segunda vía es independiente de Ii y HLA-DM $\alpha\beta$ , se da en ausencia de IFN- $\gamma$  y requiere altas concentraciones de antígeno para dar lugar a la activación de células T. Esta vía de presentación no convencional podría estar asociada con la tolerancia oral (Hershberg 1997).

Las células epiteliales del intestino humanas expresan moléculas MHC de clase I clásicas y HLA-I no clásicas (MICA, MICB, HLA-E, Hfe, CD1d, FcRn). La función de las moléculas clásicas *in vivo* está presuntamente relacionado con la vigilancia de infecciones intracelulares, dada la presencia de células T efectoras citolíticas antígeno específicas restringidas por clase I en el epitelio tras infecciones virales (London *et al* 1990). La expresión de CD1d en el epitelio se ha demostrado en roedores y humanos. Funciona en la presentación de antígenos lipídicos a células NKT (células T CD4<sup>+</sup> y dobles negativas que expresan una cadena  $\alpha$  del TcR invariante, V $\alpha$ 24, en asociación con V $\beta$ 11, y que expresan el marcador de células NK NKR1A *in vitro*). Si esta función tiene lugar *in vivo*, CD1d puede participar en la adquisición de antígenos lipídicos apicalmente y en su presentación, basalmente, a linfocitos T locales, homólogo al papel de la vía de las moléculas de clase II en la presentación de antígenos proteicos intraluminales (Blumberg *et al* 1999).

Además de expresar moléculas de presentación antigénica y la maquinaria necesaria para las funciones de presentación de antígenos, las células epiteliales expresan una amplia variedad de citocinas, receptores de citocinas y moléculas implicadas en unión a células T y potencialmente coestimulación. La producción regulada de un repertorio de quimiocinas inducibles o inflamatorias y homeostáticas o constitutivas por el epitelio intestinal, dirige y coordina el tráfico de células inflamatorias y efectoras en la mucosa. Las citocinas derivadas de enterocitos probablemente juegan un papel en la regulación de la migración leucocitaria que se da en la inflamación crónica característica de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal y durante la infección con patógenos microbianos (Dwinell *et al* 2003).

## **III. Objetivos**

---



En este trabajo se pretende analizar el papel de los linfocitos T de sangre periférica y de mucosa de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal, y la obtención de un posible modelo de estudio de esta enfermedad, mediante la transformación de linfocitos T de pacientes, con el virus T linfotrópico *Herpesvirus saimiri* (HVS). Las líneas celulares de crecimiento estable permiten realizar estudios más amplios y eliminan el problema de la escasez de muestra y la difícil obtención de células de mucosa de estos pacientes.

Por otra parte el trabajo trata del estudio de las células dendríticas, posiblemente implicadas en el desarrollo de Enfermedad Inflamatoria Intestinal, tanto en mucosa intestinal sana como procedente de pacientes con esta patología. Se estudia la presencia de células dendríticas y las distintas subpoblaciones en diferentes localizaciones intestinales, lugares de inducción de la respuesta inmunológica, como placas de Peyer, y lugares efectores como la *lamina propria* del colon.

Los objetivos concretos del trabajo se detallan a continuación:

- 1- Estudio del fenotipo y función de linfocitos de sangre periférica de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal (Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa).
- 2- Estudio fenotípico y funcional de linfocitos de mucosa intestinal de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal.
- 3- Obtención de líneas celulares estables de linfocitos T, de sangre periférica y de mucosa, de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal con el fin de realizar estudios más extensos, mediante la transformación con HVS.
- 4- Realización de estudios fenotípicos y funcionales con las líneas celulares T-HVS de sangre periférica y de mucosa procedentes de pacientes con Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa. Comparación con los resultados obtenidos a partir de las células en fresco.
- 5- Comparación de los resultados obtenidos en líneas celulares HVS de mucosa y de sangre periférica.
- 6- Estudio de las subpoblaciones de células dendríticas en distintas localizaciones intestinales, en condiciones normales y en Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

# **IV. Materiales y métodos**

---

## 1 - Pacientes

En este trabajo se incluyen 34 pacientes afectados de Enfermedad Inflamatoria Intestinal seguidos en el Servicio de Gastroenterología del Hospital 12 de Octubre de Madrid. De éstos, 22 (14 mujeres de 22 a 52 años, y 8 hombres de 19 a 51 años) padecen Enfermedad de Crohn y 12 (5 mujeres de 35 a 83 años, y 7 hombres de 37 a 70 años) Colitis Ulcerosa. Las muestras procedentes de estos pacientes se destinaron a la realización de estudios de células mononucleares de sangre periférica en fresco, y a la obtención de líneas celulares T-HVS de sangre periférica y de mucosa.

Los estudios fenotípicos de tejido en fresco, tanto de células mononucleares de *lamina propria* como de células dendríticas, se han realizado a partir de muestras procedentes de 19 pacientes del Servicio de Gastroenterología, 2 pacientes de Enfermedad de Crohn (mujeres de 63 y 71 años), 5 pacientes de Colitis Ulcerosa (1 mujer de 34 años y 4 hombres 60 a 80 años) y 12 controles (3 mujeres de 74 a 83 años y 9 hombres de 64 a 88 años), 8 pacientes del Servicio de Gastroenterología Pediátrica del Southampton General Hospital de Southampton (3 pacientes de EC, 1 de CU, 1 control y 3 colitis no-EC, no-CU), y 5 pacientes (3 controles y 2 colitis no-EC, no-CU) del Royal Free Hospital de Londres.

Como control para los ensayos realizados a partir de muestras de sangre se ha utilizado una población de 97 adultos voluntarios sanos. En cuanto a los estudios de tejido, se utiliza como control muestras procedentes de pacientes sometidos a cirugía por razones distintas a Enfermedad Inflamatoria Intestinal, generalmente resecciones debidas a carcinoma de colon, tomándose la muestra de una zona lo más alejada posible del tumor y sana según el estudio de anatomía patológica.

En la Tabla 2 se detalla el diagnóstico y tratamiento de los pacientes en el momento del análisis. En el estudio se han incluido únicamente las muestras procedentes de pacientes con EC y CU determinadas, no los pacientes de EII indeterminada, y como control las muestras de mucosa sana.

## 2 - Obtención de células

### 2.1 - Células mononucleares de sangre periférica

A partir de 10 ml de sangre heparinizada se aíslan células mononucleares de sangre periférica (CMSP) mediante centrifugación en gradiente de ficoll. La sangre diluida 1:1 con suero salino se añade sobre 3 ml de ficoll (Lymphoprep Axis Shield PoC AS, Oslo, Noruega). Tras centrifugación a 800g durante 45 minutos a temperatura ambiente se recoge la "nube" de CMSP que contiene linfocitos y monocitos. Se lavan las células dos veces con suero salino (Laboratorios Grifols, Barcelona, España) centrifugando 10 minutos a 300g. Finalmente se resuspenden las células en el medio adecuado para su cultivo o para el experimento siguiente. Una parte de las células así obtenidas se utiliza para realizar un estudio fenotípico y funcional y otra parte se destina a la obtención de líneas estables T-HVS con las que realizar estudios posteriores.

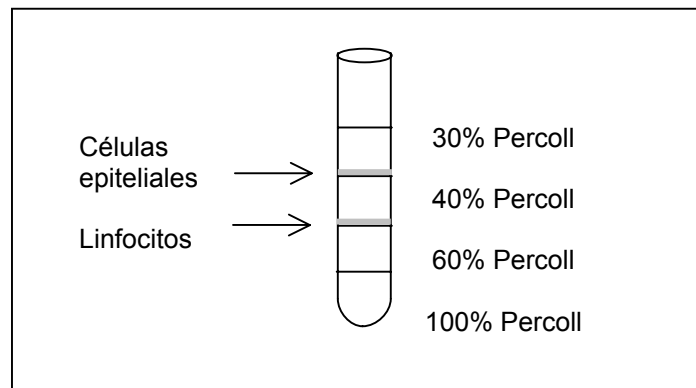
## 2.2 - Células mononucleares de *lamina propria* intestinal

A partir de resecciones de colon o íleon terminal recién extraídas y transportadas en medio RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Reino Unido) con 10% de suero de ternera fetal (FCS, foetal calf serum Bio Whittaker, Verviers, Bélgica) y 1% de antibiótico, Penicilina - Estreptomicina (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Reino Unido), y gentamicina (Hoechst Marion Rousel, Frankfurt, Alemania) se aíslan las células mononucleares de lamina propria (CMLP) mediante el siguiente tratamiento enzimático. En primer lugar se separa la mucosa de la submucosa. Para eliminar suciedad y bacterias de la muestra se lava cinco veces mediante agitación suave con CMF-HBSS sin calcio ni magnesio (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Reino Unido) con 1% de antibiótico. A continuación se trata la mucosa con DTT 1mM (BDH Biochemical, Poole, Reino Unido) en CMF-HBSS y 1% de antibiótico durante 15 minutos en agitación a temperatura ambiente, con el fin de eliminar el *mucus*. Posteriormente, para separar el epitelio, se corta la muestra con bisturí en trozos de tamaño no superior a 2mm y se incuban en CMF- HBSS más 1% de antibiótico, con una concentración de EDTA (Panreac Química, Barcelona, España) 1mM, en agitación a 37°C, durante 30 minutos. Se retira el sobrenadante y se repite el lavado con EDTA 1mM de 3 a 5 veces, hasta que no se observan restos de epitelio en el medio. Por último se realiza un último lavado de 15 minutos en agitación a 37°C, con CMF-HBSS 1% de antibiótico, para retirar el EDTA. Una vez lavada la muestra, se somete a digestión con colagenasa de tipo I (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) a una concentración de 1 mg/ml en CMF-HBSS más 1% de antibiótico, el tiempo suficiente para que la muestra quede totalmente disgregada. El resultado del tratamiento con colagenasa se pasa por un filtro de 100 µm y se lava dos veces con CMF-HBSS, 1% de antibiótico, centrifugando 10 minutos a 500g y temperatura ambiente. A continuación, se somete la muestra a una centrifugación de 35 minutos a 500g a 18°C en gradiente de Percoll (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU). Se prepara un gradiente formado por cuatro fases de distintas concentraciones de Percoll: 100%, 60%, 40% y 30%. La muestra se aplica diluida en la fase de 40% de Percoll. Tras la centrifugación, las células se han separado y las células mononucleares de *lamina propria* se encuentran entre las fases de 60% y 40%. Se recoge la "nube" de células y se lava dos veces con PBS (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Reino Unido) centrifugando 10 minutos, a 4°C y 500g. Finalmente, se resuspenden las células en el medio de cultivo y la concentración deseada.

En el caso de biopsias, el rendimiento de la extracción de células no es suficiente para conseguir una infección eficaz por el *Herpesvirus saimiri* que llevase a la obtención de líneas celulares, de manera que el procesamiento de biopsias de colon destinadas a la obtención de líneas T-HVS era únicamente mecánico, y no se sometía la muestra a digestión enzimática y posterior separación en gradiente de Percoll. Las muestras se lavan con CMF-HBSS y antibiótico (1%) agitando suavemente. Posteriormente se trocean con bisturí intentando disgregar el tejido lo máximo posible, directamente en el medio de infección (Ver apartado siguiente).

Las células obtenidas mediante estos procedimientos se utilizaron para la realización de estudios fenotípicos de células mononucleares de *lamina propria* en fresco, para la obtención de líneas celulares T-HVS de mucosa, y para el estudio de células dendríticas en la mucosa intestinal.

**Figura 2.-** Gradiente de Percoll.



### 2.3 - Células de placas de Peyer

A partir de biopsias de mucosa de íleon, se certifica la presencia de placas de Peyer en el tejido mediante el uso de una lupa. La biopsia se lava 3 veces con CMF-HBSS (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Reino Unido), 1% de antibiótico (Antibiotic-Antimycotic, Gibco) mediante agitación suave. Se incuba 20 minutos con EDTA 1mM en CMF-HBSS 1% de antibiótico en agitación a 37°C. Se lava con HBSS más antibiótico en las mismas condiciones durante 10 minutos y se incuba con colagenasa tipo I (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) 1 mg/ml hasta que la muestra está digerida completamente. El resultado de la digestión se pasa por un filtro de 100  $\mu\text{m}$  y se lava dos veces con CMF-HBSS más 1% de antibiótico por centrifugación a 500g, 10 minutos, a 4°C. Por último se resuspenden las células en el medio adecuado para la realización de los ensayos pertinentes. Las células de placas de Peyer se han utilizado para el estudio de la presencia de células dendríticas mediante citometría de flujo.

Las biopsias de íleon que no presentan folículo se tratan del mismo modo que las que poseen placa de Peyer, para estudio de células dendríticas de la mucosa.

### 3 - Obtención y cultivo de líneas celulares T-HVS

Las células aisladas se resuspenden a una concentración de  $1-3 \times 10^6$  células/ml en una mezcla de dos medios de cultivo en proporción 1:1 RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Reino Unido) y Panserin 401 (Pan, Hamburgo, Alemania), con 10% FCS (Bio Whittaker, Verviers, Bélgica) y 1% L-glutamina (Gibco BRL, Life Technologies), suplementados con 100 U/ml de IL-2 humana recombinante (rhIL-2, TECIN, cedida por Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ, EEUU). En el caso de líneas obtenidas a partir de biopsias, se realiza la disgregación mecánica en este medio de infección y a continuación se sigue el protocolo común.

Los cultivos se exponen una vez a dosis infecciosas de HVS cepa C-488 en presencia de rhIL-2 y PHA 2  $\mu$ g/ml. Los cultivos control se tratan de manera idéntica omitiendo el HVS.

Después de la infección, las células se suplementan regularmente con medio completo, incluyendo 50 U/ml de rhIL-2. La muerte de los cultivos control frente al crecimiento sostenido y la morfología linfoblastoide, sugiere la inmortalización de los cultivos. Dos meses después de la inoculación del HVS, las líneas celulares están establecidas, con una morfología y un fenotipo de superficie estables (Biesinger *et al* 1992).

### 4 - Marcaje en superficie. Citometría de flujo

Para el estudio de marcadores fenotípicos de superficie, las células, recién extraídas de sangre o tejido, o bien las líneas celulares T-HVS en cultivo, se lavan dos veces, por centrifugación a 300g durante 10 minutos a 4°C, con PBS (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Reino Unido) con un 0.4% de FCS y 1 g/l de azida sódica (Sigma). A continuación, se incuban  $2 \times 10^5$  células durante 30 minutos, a 4°C, en oscuridad, con los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la molécula o moléculas que se desea analizar en cada caso. Posteriormente, las células se lavan de nuevo dos veces con PBS, más 0.4% de FCS y 1g/l de azida sódica y se analizan en el citómetro de flujo Coulter EPICS Elite ESP (Coulter, Luton, Reino Unido). Como control negativo se utilizan anticuerpos inespecíficos con el mismo isotipo y fluoróforo que los anticuerpos específicos.

La Tabla 3 recoge un listado de los anticuerpos monoclonales utilizados en los experimentos de citometría de flujo de este trabajo.

### 5 - Estudios de proliferación celular

Las células se lavan dos veces con PBS por centrifugación a 300g durante 10 minutos. Posteriormente, se toman 100.000 células/pocillo, a una concentración de 500.000 células/ml, y se cultivan en placa de 96 pocillos durante 72 horas (CMSP) o 48 horas (líneas T-HVS) a 37°C y con humedad de 90%, en su medio habitual sin IL-2 (proliferación basal) o con diferentes mitógenos como IL-2, fitohemaglutinina (PHA), anticuerpos anti-CD2, anti-CD3 o anti-CD28, acetato de forbol mirístico (PMA) o ionomicina, solos o en distintas combinaciones mitogénicas (Tabla 4). Posteriormente, se añade 1  $\mu$ Ci  $^3$ H-timidina (Moravek Biochemicals, Brea, CA, EEUU) por pocillo

durante 18 horas y se recogen las células filtrándolas en un recolector (Filtermate 196. Packard instruments. Canberra, Australia) y pasándolas a una membrana de fibra de vidrio para posteriormente evaluar la incorporación de radiactividad al ADN celular en un contador beta (Matrix 96 TM, Packard, Canberra Company, Canberra, Australia). Los resultados se expresan en cuentas por minuto (cpm).

## 6 - Estudios de flujo de calcio celular

Se lavan las células mediante 10 minutos de centrifugación a 300g y temperatura ambiente, con el tampón de lavado, que contiene 5mM de KCl (Panreac), 147 mM de NaCl (Panreac), 0.22 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma-Aldrich), 1.1mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Panreac), 5.5 mM de glucosa (Panreac), 0.3 mM de  $\text{MgSO}_4$  (Panreac), 1.1 mM  $\text{MgCl}_2$  (Panreac) y 10 mM de HEPES (N-[2-hydroxymethyl]piperazine-N' -[ethanesulfonic acid]) (Sigma). Se resuspenden las células en el mismo tampón a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml y se incuban con Fluo-3AM (Molecular Probes. Oregon, EEUU)  $2 \mu\text{M}$  durante 30 minutos a  $30^\circ\text{C}$ , para que entre en el citoplasma celular. Posteriormente se lavan dos veces con tampón de lavado, centrifugando a 300g, 5 minutos, a  $4^\circ\text{C}$ . Se añade  $\text{Ca}^{2+}$  a una concentración de  $1 \mu\text{M}$  y se incuba a  $4^\circ\text{C}$  durante 10 minutos. Una vez transcurridos se atempera el tubo a  $37^\circ\text{C}$  y se pasa por el citómetro de flujo durante 10 minutos durante los cuales se van añadiendo los diferentes estímulos. De este modo se puede observar el calcio intracelular basal; tras la estimulación con anticuerpo anti-CD3 0.04-0.4  $\mu\text{g/ml}$  (sobrenadante del hibridoma T3b, cedido por la Dra. Paloma Sánchez- Mateos. Servicio de Inmuno-oncología. Hospital Gregorio Marañón); tras añadir anticuerpo anti-ratón IgG 0.02 mg/ml (Sigma Aldrich), que actúa como entrecruzador; y la liberación total del calcio intracelular tras la adición de ionomicina  $2 \mu\text{M}$  (Calbiochem, La Jolla, CA, EEUU). Los tiempos seleccionados para añadir cada estímulo son aquellos que permitían observar el efecto del estímulo de forma más clara.

## 7 - Inmunohistoquímica

El estudio inmunohistoquímico para la detección de células dendríticas (DC) plasmacitoides se realiza sobre cortes de intestino congelado, fijados con acetona durante 20 minutos. Se lava el tejido con PBS durante 2 minutos y posteriormente se añade el anticuerpo primario (anti ( $\alpha$ ) BDCA-2, o nada, en el caso del control negativo) y se incuba durante 1 hora en cámara húmeda. Después de lavar 3 veces con PBS se añade anticuerpo secundario conjugado con biotina, conejo anti-ratón (parte del kit Strept ABCComplex/AP de Dako, Glostrup, Dinamarca). Se incuba en cámara húmeda durante 30 minutos y se retira el exceso de anticuerpo lavando 3 veces con PBS. A continuación se añaden los reactivos A y B del kit, que contienen, respectivamente, estreptavidina, y fosfatasa alcalina unida a biotina. Se deja incubar 30 minutos en las condiciones anteriores y se lava 4 veces con PBS. Finalmente se añade el sustrato de la enzima, Fast Red (Dako), se deja revelar y se analiza en el microscopio óptico (Nikon. Tokio, Japón).

## 8 - Inmunofluorescencia

La técnica de inmunofluorescencia se realiza sobre el mismo tipo de tejido que la inmunohistoquímica y se lava la muestra con PBS de la misma forma.

### 8.1 - Inmunofluorescencia directa

En la inmunofluorescencia directa, tras el lavado de la muestra, se añade un anticuerpo marcado con fluorescencia  $\alpha$ CD11c para DC mieloides y  $\alpha$ CD3 para la visualización de la morfología de las placas de Peyer mediante la localización de los linfocitos T). Se deja incubar durante 30 minutos en cámara húmeda y oscuridad. Se retira el anticuerpo no unido mediante 3 lavados con PBS y se analiza en un microscopio de fluorescencia (Nikon) o en un microscopio confocal Leica TCS SP2 (Leica. Heerburgg, Suiza).

Como control negativo se utiliza un anticuerpo inespecífico del mismo isotipo y conjugado al mismo fluoróforo que el anticuerpo específico.

### 8.2 - Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Si se trata de inmunofluorescencia indirecta, se añade el anticuerpo primario no conjugado a un fluoróforo ( $\alpha$ BDCA-2 para DC plasmacitoides,  $\alpha$ CD68 para distinguir los macrófagos de las DC mieloides, o nada en el caso del control negativo) y se incuba durante 1 hora en cámara húmeda. A continuación se lava 3 veces con PBS y se incuba 30 minutos con un anticuerpo secundario, que se une al primario. El anticuerpo secundario puede ir unido a una molécula fluorescente, en cuyo caso, tras lavar la muestra 3 veces con PBS se analiza en el microscopio de fluorescencia o microscopio confocal. Para la detección de BDCA-2 se ha utilizado un anticuerpo secundario unido a biotina, en este caso, tras la incubación de 30 minutos y los lavados con PBS, se realiza una tercera incubación de 30 minutos con estreptavidina marcada con Texas Red (Dako). A continuación se retira el exceso de reactivo lavando tres veces con PBS y se analiza por microscopía de fluorescencia.

El control negativo de los ensayos de inmunofluorescencia indirecta se ha realizado utilizando los mismos anticuerpos y reactivos que en el experimento de interés, excepto el anticuerpo primario específico.

En la tabla 5 se exponen los anticuerpos utilizados en los análisis de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, directa e indirecta.

## 9 - Análisis estadístico

En el análisis de los resultados se han aplicado las pruebas estadísticas de comparación de media aritmética, U de Mann-Whitney o T-test, según las características de las poblaciones comparadas.

Para la realización de estos análisis se han utilizado los programas informáticos SIGMA (Horus Hardware), Prophet (BBN Systems and Technologies) y Graphpad InStat (Graphpad Software 1.15).



## **10 - Consideraciones éticas**

Todos los experimentos se han llevado a cabo con la aprobación del Comité Ético de la institución. Las muestras de sangre se recogieron durante el seguimiento de rutina de los pacientes.

Tabla 2.- Datos de los pacientes a partir de los cuales se obtuvieron muestras de sangre o tejido.

A. Pacientes seguidos en el Servicio de Gastroenterología del Hospital 12 de Octubre de Madrid.

FECHA RECEP.	TIPO EII	SEXO	FECHA NACIMIENTO	TRATAMIENTO	FECHA DGCO.	MUESTRA	ESTADIO
18/4/99	E.C.	M	1924	5 ASA oral 6g/día	1994	Sangre Biopsias	Moderado/severo
7/9/99	E.C.	H	1962	Azatioprina oral 100 mg/día 5ASA oral 2g/día	1991	Sangre Biopsias	1.leve 2. inactivo
10/9/99	E.C.	M	1954	Corticoides clásicos 5mg/día 5 ASA oral 1g/día	1987	Sangre Biopsias	inactivo
14/9/99	C.U.	H	1939	Azatioprina oral 100 mg/día 5ASA oral 2.4mg/día 5ASA tópica 1g/día	1986	Sangre Biopsias	1.inactivo 2.leve
17/9/99	Posible E.C.	M	1972	Sin medicación	Mayo 1999		
21/9/99	E.C.	M	1952	Sin medicación	1981	Sangre Biopsias	1.severa 2.inactivo
6/10/99	C.U.	M	1968	Corticoides clásicos v.o Cort clásicos tópicos 2 mg/día Azatioprina oral 125 mg/día 5ASA oral 3g/día 5ASA tópica 1g/día	1997	Sangre Biopsias	inactivo
6/10/99	E.C.	H	1957	Corticoides clásicos v.o 16mg/día Budesonida oral	1995	Sangre Biopsias	severa
26/10/99	C.U / Posible E.C.	H	1971	Corticoides clásicos 7.5mg/día Salazopirina 2-1-2	Agosto 1998	Sangre Biopsias	1.leve 2. inactivo
29/10/99	E.C.	M	1976	Corticoides clásicos 10mg/día Supositorio mesalazina / 48 h	1993	Sangre Biopsias	moderada
4/1/00	E.C.	M	1966	Corticoides clásicos 30mg/día Azatioprina oral 100mg/día 5 ASA oral 3gr/día	1985	Sangre Biopsias	severa
20/1/00	E.C.	M	1982	5 ASA oral 3gr/día claversal 500	1997	Sangre Biopsias	Leve/moderada
29/2/00	E.C.	M	1954	Corticoides clásicos 10mg/día Corticoides clásicos tópicos 1 aplicación/24 h	1987	Sangre Biopsias	1.severa 2.inactivo
4/4/00	C.U.	H	1934	5 ASA oral 3g/día 5 ASA tópica 1g/48-72h	1980	Sangre Biopsias	inactivo

**Tabla 2.-** A. Pacientes seguidos en el Servicio de Gastroenterología del Hospital 12 de Octubre de Madrid. Continuación.

FECHA RECEP.	TIPO EII	SEXO	FECHA NACIMIENTO	TRATAMIENTO	FECHA DGCO.	MUESTRA	ESTADIO
15/1/01	E.C.	M	1980	Azatioprina 1 mg/Kg/día		Sangre Biopsias	inactivo
25/1/01	E.C.	M	1955	Sin medicación	1978	Sangre Biopsias	inactivo
25/1/01	E.C.	M	1964	5 ASA oral 3 g V.O:	1995	Sangre Biopsias	moderado
29/1/01	C.U.	M	1969	Sin medicación	1997	Sangre Biopsias	leve
12/2/01	C.U.	M	1963	Corticoides clásicos 40mg/24h 5 ASA 2 comp/dia	Enero 1999	Sangre Biopsias	moderado
13/2/01	E.C.	H	1951	Azatioprina oral 150 mg 5 ASA oral 1,6mg V.O.	1995	Sangre Biopsias	inactivo
15/2/01	E.C.	H	1962	Corticoides clásicos 5mg/24h 5 ASA oral claversal 3g omeprazol Rythmonorm	Enero 2000	Sangre Biopsias	leve
20/2/01	C.U.	M	1965	Corticoides clásicos 60mg I.V./24 h 5 ASA oral 2 comp/8 h	Enero 1994	Sangre Biopsias	1.severa 2.inactivo
22/2/01	E.C.	H	1963	Corticoides clásicos 20mg V.O. 5 ASA oral 3 comp/2 h	1988	Sangre Biopsias	leve
26/2/01	E.C.	H	1963	Sin tratamiento	1993	Sangre Biopsias	inactivo
27/2/01	E.C.	M	1952	Budesonida oral 9 mg/dia Acfol 1 comp/24 h Flagyl 1gr/24 h	1996	Sangre Biopsias	leve
27/2/01	C.U.	H	1934	Azatioprina oral 75mg/dia	1989	Sangre Biopsias	inactivo
18/4/01	C.U.	H	1940	Corticoides clásicos V.O. 10mg/dia Budesonida tópica 1enema/alterno Azatioprina oral 150mg/dia Salazopirina 2 comp/8h Acfol 1 comp/dia	1983	Sangre Biopsias	inactivo
26/4/01	C.U.	H	1937	Corticoides clásicos V.O. 40mg/dia 5 ASA oral 800mg/8h	Dic. 2000	Sangre Biopsias	1.leve- moderada 2.inactivo
30/4/01	C.U.	H	1967	5 ASA oral 1 comp/8 h 5 ASA tópica espuno 1 aplic/semana	1998	Sangre Biopsias	inactivo

**Tabla 2.-** A. Pacientes seguidos en el Servicio de Gastroenterología del Hospital 12 de Octubre de Madrid.  
Continuación.

FECHA RECEP.	TIPO EII	SEXO	FECHA NACIMIENTO	TRATAMIENTO	FECHA DGCO.	MUESTRA	ESTADIO
17/5/01	E.C.	H	1985	Corticoides clásicos V.O. 20mg/24 h 5 ASA oral 40 mg/8 h	Mayo 2001	Sangre Biopsias	moderado
21/5/01	E.C.	H	1953	Corticoides clásicos 60mg/24h/iv Azatioprina 75mg/24h		Sangre	
21/5/01	C.U.	M	1921	Corticoides clásicos 40mg/24h/iv 5ASA oral 2comp/8h	2001	Sangre	
22/5/01	E.C.	M		Corticoides clásicos 40 mg/24h/iv	2000	Sangre	
23/5/01	C.U.	H	1962	5 ASA oral 500mg/8h 5 ASA tópica 1 sup/noche	1993	Sangre Biopsias	inactivo
28/5/01	E.C.	M	1963	Corticoides clásicos V.O. 6mg/24 h Azatioprina oral 50mg/24 h 5 ASA oral 1 c/8h	1988	Sangre Biopsias	severa
28/5/01	E.C.	M	1955	Corticoides clásicos 5mg/24h/vo	1999	Sangre	
31/5/01	E.C.	M	1965	Budesonida oral 3 mg/d Azatioprina oral 125 mg/d Salazopirina 2-2-2	1983	Sangre Biopsias	inactiva

Tabla 2.- Continuación

B. Pacientes seguidos en el Servicio de Gastroenterología del Southampton General Hospital de Southampton, UK.

FECHA RECEP.	ENFERMEDAD	SEXO	FECHA DE NACIMIENTO	MUESTRA
1/08/2002	Adenocarcinoma. Hemicolectomía derecha. (Zona sana. Control)	H	1916	Resección de colon Resección de íleon
1/08/2002	Carcinoma. Hemicolectomía derecha. (Zona sana. Control)	H	1926	Resección de íleon
05/09/2002	Carcinoma. Colectomía total. (Zona sana. Control)	H	1922	Resección de colon
12/09/2002	CU Colectomía total	M	1970	Resección de colon
26/09/2002	Carcinoma. Colectomía sigmoidea. (Zona sana. Control)	H	1919	Resección de colon
10/10/2002	Carcinoma rectal. Resección perineal abdominal. (Zona sana. Control)	M	1921	Resección de colon
07/11/2002	Adenoma rectal. Resección anterior. (Zona sana. Control)	H	1929	Resección de colon
21/11/2002	Carcinoma de colon. (Zona sana. Control)	M	1929	Resección de colon
27/11/2002	CU Panproctocolectomía.	H	1924	Resección de colon
16/01/2003	CU Panproctocolectomía	H	1927	Resección de colon
29/01/2003	CU Panproctocolectomía.	H	1926	Resección de colon
04/02/2003	EC	M	1963	Resección de colon
06/02/2003	Carcinoma. Hemicolectomía derecha extendida. (Zona sana. Control)	H	1927	Resección de colon Resección de íleon
13/02/2003	Carcinoma de recto. Hemicolectomía derecha. (Zona sana. Control)	H	1935	Resección de colon Resección de íleon
24/02/2003	Carcinoma de recto. (Zona sana. Control)	H	1916	Resección de colon
27/02/2003	EC íleon terminal	M	1971	Resección de íleon
05/03/2003	Carcinoma de ciego. (Zona sana. Control)	M	1930	Resección de colon
13/03/03	Carcinoma de ciego. Colectomía subtotal. (Zona sana. Control)	H	1940	Resección de colon
19/03/2003	CU Panproctocolectomía.	H	1944	Resección de colon

**Tabla 2.-** Continuación

C. Pacientes seguidos en el Servicio de Gastroenterología Pediátrica del Southampton general Hospital de Southampton, UK.

FECHA RECEP.	ENFERMEDAD	SEXO	FECHA DE NACIMIENTO	MUESTRA
2/10/2002	Diarrea crónica Post colectomía (Hirschsprung)	H	2000	Biopsia ileon
2/10/2002	LNH (Hiperplasia linfonodular)	M	1990	Biopsia ileon
16/10/2002	CU	M	1999	Biopsia ileon
23/10/2002	EC	H	1988	Biopsia ileon
30/10/2002	Posible UC	H	1989	Biopsia ileon
30/10/2002	EC	M	1990	Biopsia ileon
21/11/2002	EC	H	1990	Biopsia ileon
17/01/2003	EII artritis.	H	2003	Biopsia ileon

D. Pacientes seguidos en el Servicio de Gastroenterología Pediátrica del Royal Free Hospital de Londres, UK.

FECHA RECEP.	ENFERMEDAD	SEXO	FECHA DE NACIMIENTO	MUESTRA
28/2/2003	Hiperplasia linfonodular. Control.	H	1989	Biopsia ileon
28/2/2003	Nodulación en estómago. Colon normal.	M	1987	Biopsia ileon
28/2/2003	Hiperplasia linfonodular. Control.		1991	Biopsia ileon
19/3/2003	Histología normal. Estreñimiento, colitis eosinofílica previa.		1988	Biopsia ileon
21/3/2003	Posible CU Ileon terminal:normal Colon: pancolitis moderada- severa		1997	Biopsia ileon

Tabla 3.- Anticuerpos monoclonales utilizados en los estudios fenotípicos por citometría de flujo.

ANTICUERPO	CONJUGADO	ISOTIPO	CLON	CASA COMERCIAL
$\alpha$ -CD2	FITC	IgG1	T11	Coulter, Miami, FL, USA
$\alpha$ -CD3	FITC	IgG1	UCTH1	Immunotech, Marseille, Francia
$\alpha$ -CD3	R-PE	IgG1	UCHT1	Dako, Glostrup, Dinamarca
$\alpha$ -CD3	APC	IgG1	UCHT1	Dako
$\alpha$ -CD4	PE	IgG1	13B8.2	Immunotech
$\alpha$ -CD4	R-PE	IgG1	MT310	Dako
$\alpha$ -CD8	Cy5-PE	IgG1	B9.11	Immunotech
$\alpha$ -CD8	FITC	IgG1	SK1	Becton Dickinson
$\alpha$ -CD4/CD8/CD3	FITC / PE / Cy5-PE	IgG1	13B.8 / B9.11 / UCHT1	Immunotech
$\alpha$ -CD11c	FITC	IgG1	KB90	Dako
$\alpha$ -CD14	R-PE	IgG1	TÜK4	Dako
$\alpha$ -CD16	PE	IgG1	Leu-11a-NKP15	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
$\alpha$ -CD16	PE	IgG2a	B-E16	Diaclone SAS, Besancon, Francia
$\alpha$ -CD19	PE	IgG1	SJ25-C1	Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA
$\alpha$ -CD19	PE	IgG1	4G7	Becton Dickinson
$\alpha$ -CD25	PE	IgG1	CD25-3G10	Caltag Laboratories
$\alpha$ -CD28	PE	IgG1	IOT28	Immunotech
$\alpha$ -CD34	PE	IgG1	B-K34	Diaclone SAS
$\alpha$ -CD45	PE-Cy5	IgG1	J33	Immunotech
$\alpha$ -CD45	FITC	IgG1	T29/33	Dako
$\alpha$ -CD45RA	FITC	IgG1	ALB11	Immunotech
$\alpha$ -CD45RA	FITC	IgG1	B-C15	Diaclone SAS
$\alpha$ -CD45RO	PE	IgG1	UCHL-1	Becton Dickinson
$\alpha$ -CD45RO	R-PE	IgG2a	UCHL1	Diaclone SAS

FITC -isotiocianato de fluoresceína, PE - ficoeritrina, R-PE - R-ficoeritrina, Cy5-PE - cianina 5-R-ficoeritrina, PerCP - proteína clorofila peridinina, APC - alofocianina.

Tabla 3.- Continuación.

ANTICUERPO	CONJUGADO	ISOTIPO	CLON	CASA COMERCIAL
$\alpha$ -CD56	PE	IgG1	N901-NKH-1	Immunotech
$\alpha$ -CD80	PE	IgG1	L307.4	Becton Dickinson
$\alpha$ -CD86	PE	IgG1	BU63	Caltag Laboratories
$\alpha$ -CD103	PE	IgG1	LF61	Caltag Laboratories
$\alpha$ -HLA-DR	PE	IgG1	Immu-357	Immunotech
$\alpha$ -HLA-DR	PerCP	IgG2a	L243	Becton Dickinson
$\alpha$ -TcR $\alpha\beta$	FITC	IgG1	WT31	Becton Dickinson
$\alpha$ -CD123	APC	IgG2a	AC145	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania
$\alpha$ -BDCA-2	APC	IgG1	AC144	Milteny Biotec
Control	PE	IgG2a	B-Z2	Diaclone SAS
Control	PE	IgG1	X40	Becton Dickinson
Control	PE	IgG1	DAK-GO1	Dako
Control	PerCP	IgG2a	X39	Becton Dickinson
Control	FITC	IgG1	DAK-GO1	Dako
Control	FITC / PE / Cy5-PE	IgG1	679.1Mc7	Immunotech

FITC -isotiocianato de fluoresceína, PE - ficoeritrina, R-PE - R-ficoeritrina, Cy5-PE - cianina 5-R-ficoeritrina, PerCP - proteína clorofila peridina, APC - alofocianina.



Tabla 4.- Mitógenos y concentraciones utilizados en los experimentos de proliferación celular.

MITÓGENO	CASA COMERCIAL	CONCENTRACIÓN
PHA (PHA-L)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	0.5µg/ml
α-CD3 (Orthoclon OKT3)	Ortho Biotech Products, Raritan, NJ, USA	12.5 ng/ml (soluble)
α-CD3 (Orthoclon OKT3)	Ortho Biotech Products, Raritan, NJ, USA	1 µg/ml (pegado a plástico)
α-CD2 (T11 1/1 clon 6G4)	CLB, Amsterdam, The Netherlands	2.5 µg/ml
α-CD2 (T11 2/1 clon 4B2)	CLB, Amsterdam, The Netherlands	2.5 µg/ml
α-CD28 (KOLT-2)	CLB, Amsterdam, The Netherlands	50 ng/ml
PMA	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	10 ng /ml (usado individualmente)
PMA	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	1.2 ng/ml (usado en combinación con Ionomicina)
Ionomicina	Calbiochem, La Jolla, CA, USA	1 µM
IL-2	rhIL-2, TECIN, Hoffman-La Roche Inc., Newton, NJ, USA	50 U/ml

Tabla 5.- Anticuerpos utilizados en los experimentos de inmunohistoquímica, inmunofluorescencia directa e inmunofluorescencia indirecta.

ANTICUERPO	CONJUGADO	ISOTIPO	CLON	CASA COMERCIAL
α-CD11c	FITC	IgG1	KB90	Dako, Glostrup, Dinamarca
α-CD3	PE	IgG1	UCHT1	Dako
Control	FITC	IgG1	DAK-G01	Dako
Control	PE	IgG1	DAK-G01	Dako
α-CD68	No conjugado	IgG1	PG-M1	Dako
α-BDCA-2	No conjugado	IgG1	AC144	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania
Ig de conejo α-ratón	TRITC		Policlonal	Dako
Ig de conejo α-ratón	Biotina		Policlonal	Dako

Ig- Inmunoglobulinas, FITC- Isotiocianato de fluoresceína, PE-Ficoeritrina, TRITC- Isotiocianato de tetrametil rodamina.

# V. Resultados

---

## 1.- Estudios en sangre periférica

### 1.- Células mononucleares de sangre periférica en fresco

#### 1.1.1.- Estudio fenotípico

Se ha estudiado la expresión de distintas moléculas de superficie en células mononucleares de sangre periférica de 17 pacientes con Enfermedad de Crohn, 10 pacientes con Colitis Ulcerosa y 18 individuos sanos. Para el análisis se eligió la población de linfocitos, atendiendo a las características celulares de tamaño y complejidad observadas en el citómetro de flujo.

En primer lugar se muestran las características de la población de CMSP total en cuanto al porcentaje de cada tipo celular presente en esta población. En segundo lugar se detalla la expresión de marcadores fenotípicos asociados a activación, tanto en la población inicial de estudio, (información que revela el análisis de cada marcador individualmente), como en los linfocitos T, mediante el estudio de la expresión de cada marcador junto con la expresión de CD3, CD4 o CD8. Estos marcajes permiten conocer el estado de los linfocitos T de pacientes y controles en fresco, para la posterior comparación con los resultados obtenidos en las líneas celulares T-HVS.

#### ***Marcadores generales de linaje celular***

No se han encontrado diferencias significativas en la expresión de los marcadores de linaje de las diferentes subpoblaciones mononucleares (monocitos, células NK, linfocitos B, linfocitos T), ni en el porcentaje de leucocitos totales, entre la sangre de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal y de individuos control. Tan sólo aparecen diferencias relevantes en la expresión de CD45RA, disminuida en los pacientes con CU ( $42 \pm 5\%$ ) con respecto a la población control ( $60 \pm 5\%$ ;  $p < 0.05$ ) (Tabla 6).

Al analizar los marcadores característicos de linfocitos T no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de células CD3<sup>+</sup> entre individuos control y pacientes con EII, ya se trate de EC o de CU. Tampoco son diferentes los porcentajes de cada una de las dos subpoblaciones de linfocitos T, CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> ni el porcentaje de linfocitos TcR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> o TcR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> entre pacientes e individuos sanos (Tabla 6).

#### ***Marcadores de activación (CD25, CD26 y HLA-DR)***

El análisis de la expresión de CD25, no muestra diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles. Lo mismo ocurre cuando se estudia la expresión conjunta de CD25 y CD3, o CD25 y CD8. Tampoco se han encontrado diferencias significativas entre pacientes con EII e individuos sanos en la expresión de CD26, aisladamente o en la población CD3<sup>+</sup> (Tabla 7).

**Tabla 6.- Porcentaje de expresión de los marcadores específicos de linaje en CMSP de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal e individuos control.**

<b>Marcador</b>	<b>Control</b>	<b>(n)</b>	<b>EC</b>	<b>(n)</b>	<b>CU</b>	<b>(n)</b>
<b>CD45</b>	97 ± 1	(18)	95 ± 3	(17)	97 ± 2	(10)
<b>CD45RA</b>	60 ± 5	(11)	49 ± 5	(9)	42 ± 5 *	(6)
<b>CD45RO</b>	19 ± 4	(11)	20 ± 4	(9)	34 ± 13	(6)
<b>CD14</b>	2 ± 2	(12)	4 ± 4	(12)	4 ± 4	(9)
<b>CD19</b>	6 ± 2	(6)	7 ± 2	(7)	4 ± 2	(5)
<b>CD56</b>	9 ± 2	(14)	11 ± 4	(6)	9 ± 2	(5)
<b>CD2</b>	87 ± 1	(12)	86 ± 5	(6)	91 ± 3	(6)
<b>CD3</b>	77 ± 1	(18)	73 ± 4	(17)	78 ± 3	(10)
<b>CD4</b>	50 ± 2	(18)	47 ± 4	(17)	55 ± 4	(10)
<b>CD8</b>	29 ± 2	(18)	30 ± 2	(17)	24 ± 2	(10)
<b>CD4<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup></b>	48 ± 2	(18)	46 ± 4	(16)	54 ± 5	(9)
<b>CD8<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup></b>	24 ± 2	(18)	24 ± 3	(15)	21 ± 2	(9)
<b>TcRαβ</b>	74 ± 3	(5)	78 ± 14	(4)	82 ± 1	(3)
<b>TcRγδ</b>	1 ± 0.5	(5)	1 ± 0	(5)	1 ± 0.2	(2)

Media aritmética (X) ± error estándar de la media (SEM). (n) número de muestras analizadas.

\*p<0.05 respecto a controles.

**Tabla 7.- Porcentaje de expresión de CD25, CD26 y HLA-DR en CMSP de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal e individuos control.**

<b>Marcador</b>	<b>Control</b>	<b>(n)</b>	<b>EC</b>	<b>(n)</b>	<b>CU</b>	<b>(n)</b>
<b>CD25</b>	5 ± 1	(18)	4 ± 1	(17)	5 ± 2	(10)
<b>CD25<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup></b>	5 ± 2	(10)	4 ± 1	(11)	3 ± 1	(6)
<b>CD25<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup></b>	0.5 ± 0.3	(11)	1 ± 1	(6)	0.3 ± 0.04	(6)
<b>CD25<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup></b>	3 ± 1	(11)	4 ± 2	(6)	7 ± 2	(6)
<b>CD26</b>	5 ± 2	(7)	9 ± 5	(4)	3 ± 2	(5)
<b>CD26<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup></b>	5 ± 2	(6)	1 ± 0.4	(2)	2 ± 1	(4)
<b>HLA-DR</b>	8 ± 1	(15)	10 ± 2	(14)	6 ± 1	(6)
<b>HLA-DR<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup></b>	4 ± 1	(11)	3 ± 1	(5)	3 ± 0.3	(3)
<b>HLA-DR<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup></b>	5 ± 1	(11)	6 ± 1	(5)	4 ± 2	(3)

X ± SEM. (n) número de muestras analizadas.

Tampoco existen diferencias significativas en la expresión de HLA-DR entre pacientes con EII y controles (Tabla 7). Gran parte de la expresión de HLA-DR no se encuentra en los linfocitos T (HLA-DR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>) sino en las células CD3<sup>-</sup>. Teniendo en cuenta que el análisis tiene lugar en una “ventana” que incluye fundamentalmente linfocitos, el porcentaje de células HLA-DR<sup>+</sup> corresponde, por tanto, a células CD3<sup>-</sup> y CD14<sup>-</sup>, probablemente CD19<sup>+</sup> (linfocitos B), que tampoco son significativamente diferentes entre pacientes y controles.

#### **Moléculas coestimuladoras (CD28, CD80 y CD86) y CD103**

El porcentaje de CMSP que expresan CD28 es menor en pacientes con EC que en controles, y en pacientes con CU que en EC y controles (Tabla 8). Sin embargo estas diferencias no son estadísticamente significativas ya que la dispersión de los resultados es muy elevada en los pacientes. Al analizar la expresión de esta molécula en la población CD3<sup>+</sup>, se observa la misma tendencia, sin que la diferencia sea significativa. En cuanto a la expresión de CD28 en linfocitos CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, la mayor parte se expresa en células CD4 y un menor porcentaje en células CD8<sup>+</sup>. En ambos casos (CD28<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> y CD28<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) la expresión de CD28 se encuentra disminuida en CMSP de pacientes con CU respecto a controles y EC. La diferencia es estadísticamente significativa en la población CD28<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> (p<0.01 respecto a controles y EC).

**Tabla 8.- Porcentaje de expresión de CD28, CD80, CD86, y CD103 en CMSP de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal e individuos control.**

<b>Marcador</b>	<b>Control</b>	<b>(n)</b>	<b>EC</b>	<b>(n)</b>	<b>CU</b>	<b>(n)</b>
<b>CD28</b>	55 ± 4	(12)	48 ± 7	(13)	36 ± 9	(8)
<b>CD28<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup></b>	47 ± 8	(9)	43 ± 9	(9)	22 ± 10	(5)
<b>CD28<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup></b>	39 ± 6	(6)	30 ± 7	(9)	29 ± 14	(4)
<b>CD28<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup></b>	17 ± 4	(9)	14 ± 3	(9)	2 ± 1 **	(4)
<b>CD28<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup></b>	5 ± 3	(6)	10 ± 6	(4)	2 ± 0.5	(4)
<b>CD80</b>	1 ± 1	(10)	0.4 ± 0.2	(7)	0.5 ± 0.3	(6)
<b>CD80<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup></b>	1 ± 1	(7)	0.3 ± 0.1	(7)	0.1 ± 0	(4)
<b>CD80<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup></b>	0.1 ± 0.1	(7)	0.2 ± 0.1	(7)	0.05 ± 0	(4)
<b>CD86</b>	3 ± 1	(11)	5 ± 1	(6)	2 ± 1	(5)
<b>CD86<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup></b>	1 ± 0.4	(6)	1 ± 0.2	(3)	2 ± 0.3	(4)
<b>CD86<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup></b>	1 ± 0.3	(6)	2 ± 1	(3)	0.4 ± 0.2	(4)
<b>CD103</b>	5 ± 1	(6)	6 ± 2	(7)	2 ± 1	(3)

X ± SEM. (n) número de muestras. \*\*p<0.01 respecto a controles y EC

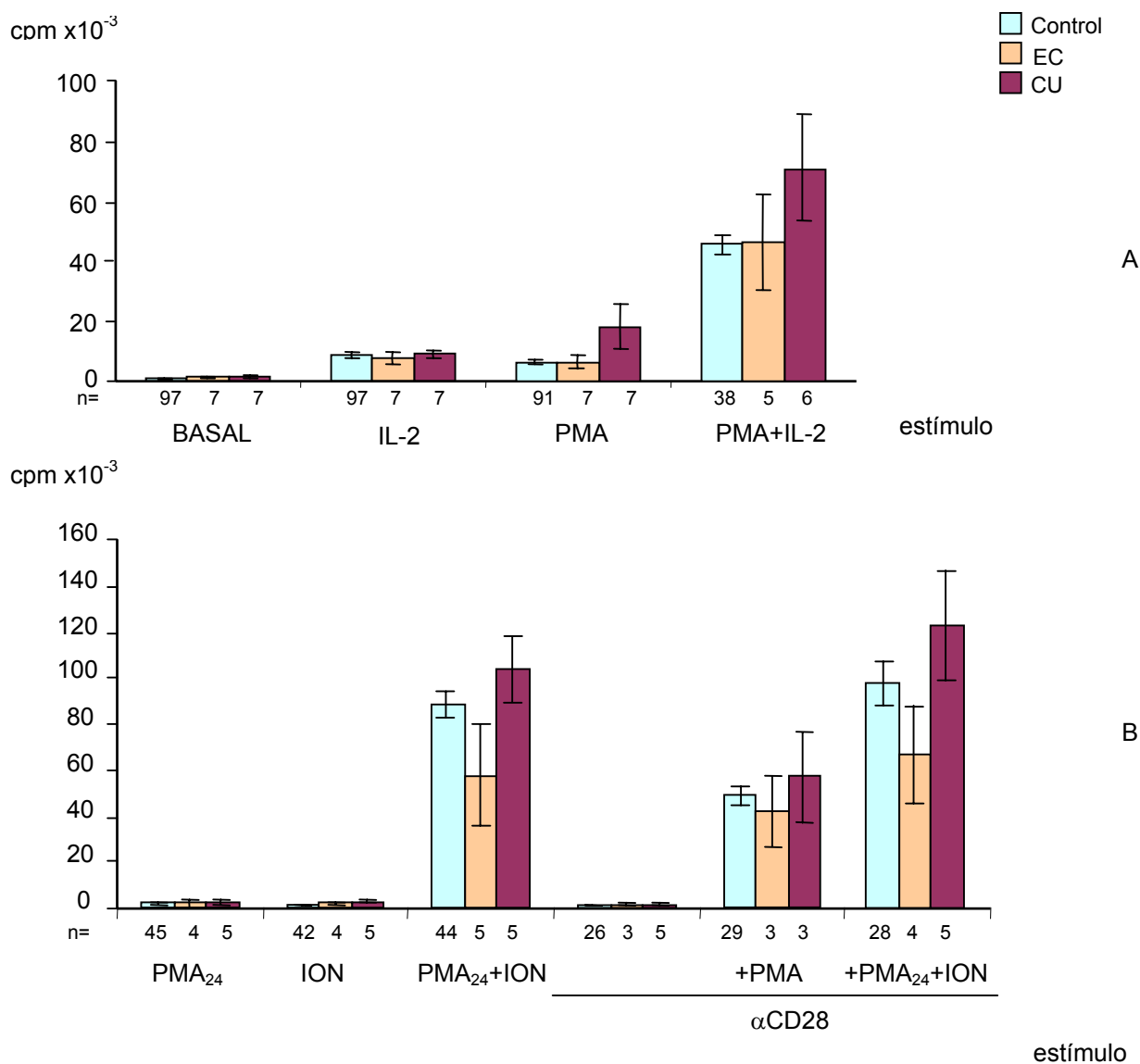
La proporción de células que expresan CD80 y de CD86 no es diferente entre CMSP de pacientes de EII e individuos control. Tampoco se encuentran diferencias significativas al analizar la coexpresión de ambas moléculas con CD3.

El porcentaje de células que expresan la integrina  $\alpha_E\beta_7$  (CD103) no se encuentra alterado significativamente en la población estudiada de sangre periférica procedente de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal respecto a individuos sanos. Una mayor expresión de este marcador, característico de linfocitos de mucosa, en CMSP de pacientes podría indicar una mayor tasa de recirculación hacia mucosas.

### 1.1.2.- Estudios de proliferación celular

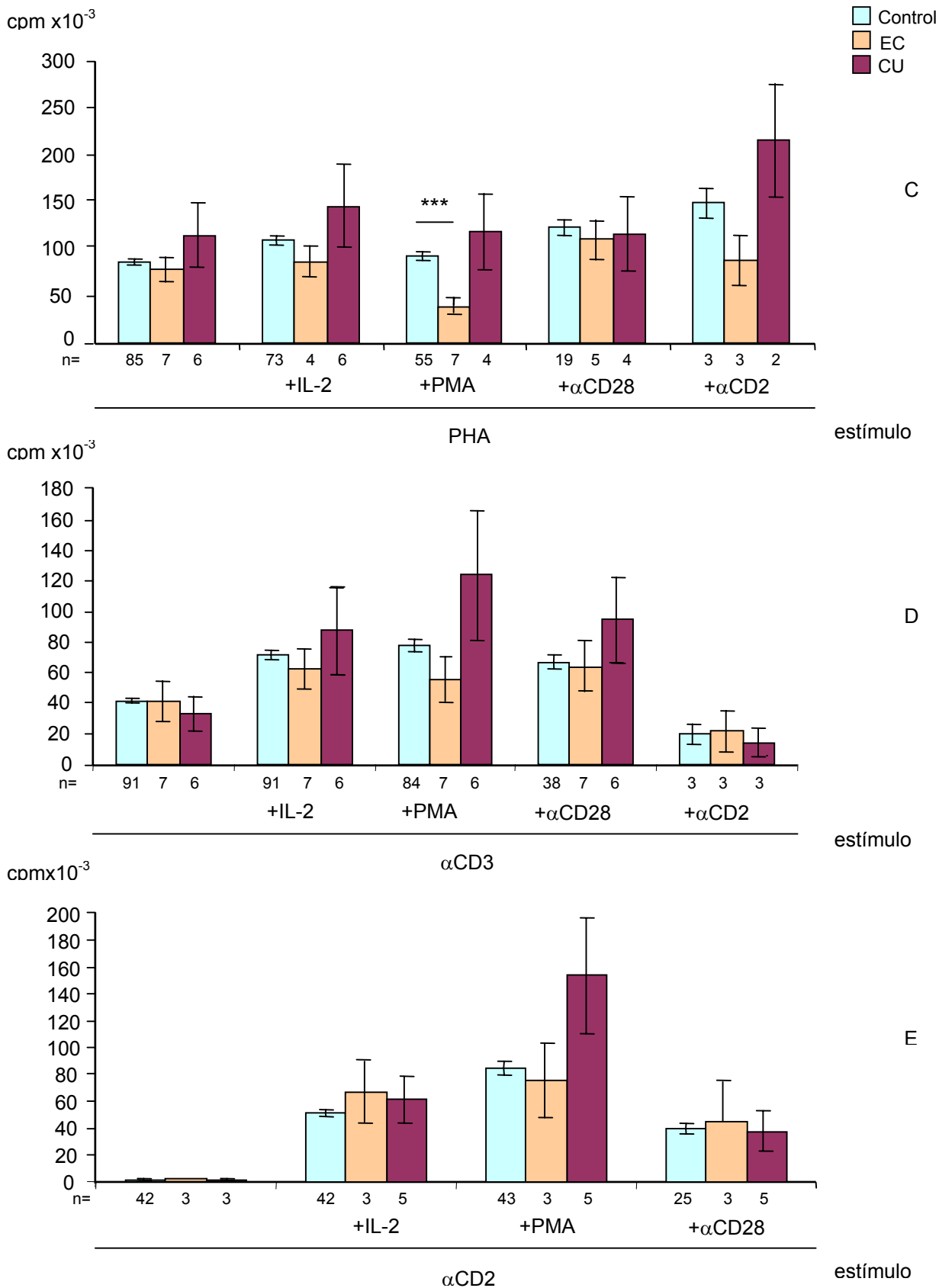
Los resultados del análisis de proliferación celular tras estimulación de CMSP con varias sustancias mitogénicas (Tabla 4), se muestran en la Figura 1. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la respuesta proliferativa de CMSP pacientes con EI respecto a CMSP de controles en la mayoría de los experimentos realizados. Únicamente al utilizar como estímulo la combinación PHA+PMA, se observa un comportamiento diferente de las células procedentes de pacientes con EC. Las CMSP de pacientes con EC ( $39 \pm 9 \text{ cpm} \times 10^{-3}$ ) muestran una respuesta proliferativa significativamente menor que las células procedentes de individuos sanos ( $93 \pm 5 \text{ cpm} \times 10^{-3}$ ;  $p < 0.001$ ).

**Figura 3.- Respuesta proliferativa en cuentas por minuto (cpm)  $\times 10^{-3}$  de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal, comparada con una población control.**



X $\pm$ SEM. n= número de muestras. \*\*\* $p < 0.001$ .

Figura 3.- Continuación.



X±SEM. n= número de muestras. \*\*\*p<0.001.



## 1.2.- Líneas celulares T-HVS de sangre periférica

La transformación de CMSP con el *Herpesvirus saimiri* permitió la obtención de 12 líneas celulares T-HVS de pacientes con Enfermedad de Crohn, 4 líneas de pacientes con Colitis Ulcerosa y 6 líneas control. Teniendo en cuenta el número de muestras totales sometidas al proceso de transformación con el sobrenadante infeccioso del virus, (22 de EC, 12 de CU y 9 controles), el porcentaje de infección ha sido 54% en CMSP de pacientes con EC, 33% en CMSP de pacientes con CU y 67% en individuos sanos.

### 1.2.1.- Estudio fenotípico

Todas las líneas obtenidas a partir de células mononucleares de sangre periférica, tanto de individuos sanos como pacientes con EII, presentan un fenotipo de células T CD8<sup>+</sup> activadas. Se ha realizado un estudio fenotípico de ciertos marcadores de superficie analizados también en CMSP sin infectar mediante citometría de flujo. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 9.- Porcentaje de expresión de diferentes marcadores de superficie en líneas celulares T-HVS de sangre periférica (SP) de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal e individuos control.**

Marcador	Control HVS SP N=5		EC HVS SP N=7		CU HVS SP N=4	
		(n)		(n)		(n)
CD45	100 ± 0.1	(6)	100 ± 0.1	(6)	98 ± 1	(6)
CD14	1 ± 0.2	(5)	1 ± 0.4	(3)	0.5 ± 0.1	(2)
CD19	0.1 ± 0.1	(2)	0.2 ± 0.1	(2)	0.3 ± 0.1	(2)
CD56	72 ± 13	(4)	87.20	(1)	67 ± 8	(7)
CD2	95 ± 5	(4)	91 ± 4	(3)	96 ± 3	(2)
CD3	98 ± 1	(9)	99 ± 0.2	(12)	99 ± 0.2	(7)
CD4	1 ± 0.2	(7)	1 ± 0.3	(9)	1 ± 0.4	(5)
CD8	90 ± 2	(5)	96 ± 2	(7)	95 ± 4	(5)
TcR $\gamma\delta$	0.2 ± 0.1	(3)	2 ± 1	(5)	0.1 ± 0.1	(3)
TcR $\alpha\beta$	95 ± 3	(4)	96 ± 2	(2)	97 ± 2	(2)
CD45RA	4 ± 3	(3)	7 ± 7	(2)	2 ± 0.3	(6)
CD45RO	65 ± 25	(2)	80 ± 14	(3)	71 ± 14	(4)
CD25	30 ± 6	(5)	38 ± 8	(7)	39 ± 11	(6)
CD26	88 ± 5	(6)	75 ± 2	(2)	99 ± 0.2	(5)
CD28	1 ± 1	(4)	1 ± 0.5	(9)	1 ± 0.4	(5)
CD80	29 ± 24	(3)	43 ± 19	(4)	13 ± 9	(5)
CD86	68 ± 13	(3)	38 ± 10	(10)	58 ± 10	(5)
HLA-DR	99 ± 0.1	(2)	99 ± 0.3	(3)	99 ± 1	(4)
CD103	2 ± 2	(2)	5 ± 2	(5)	3 ± 2	(3)

X $\pm$ SEM. (N) número de líneas. (n) número de experimentos.

### 1.2.2.- Estudios de proliferación celular

La respuesta proliferativa de las líneas celulares, al contrario de lo que ocurre en las CMSP sin infectar, presenta diferencias significativas entre las líneas HVS procedentes de pacientes con Enfermedad de Crohn, por una parte, y de individuos control y pacientes con Colitis Ulcerosa por otra parte (Tabla 10) (Figura 4). En general, las líneas obtenidas de pacientes con EC responden en mayor medida que las líneas control a la mayor parte de los estímulos utilizados, mientras que las líneas procedentes de pacientes con CU se comportan de manera similar a los controles.

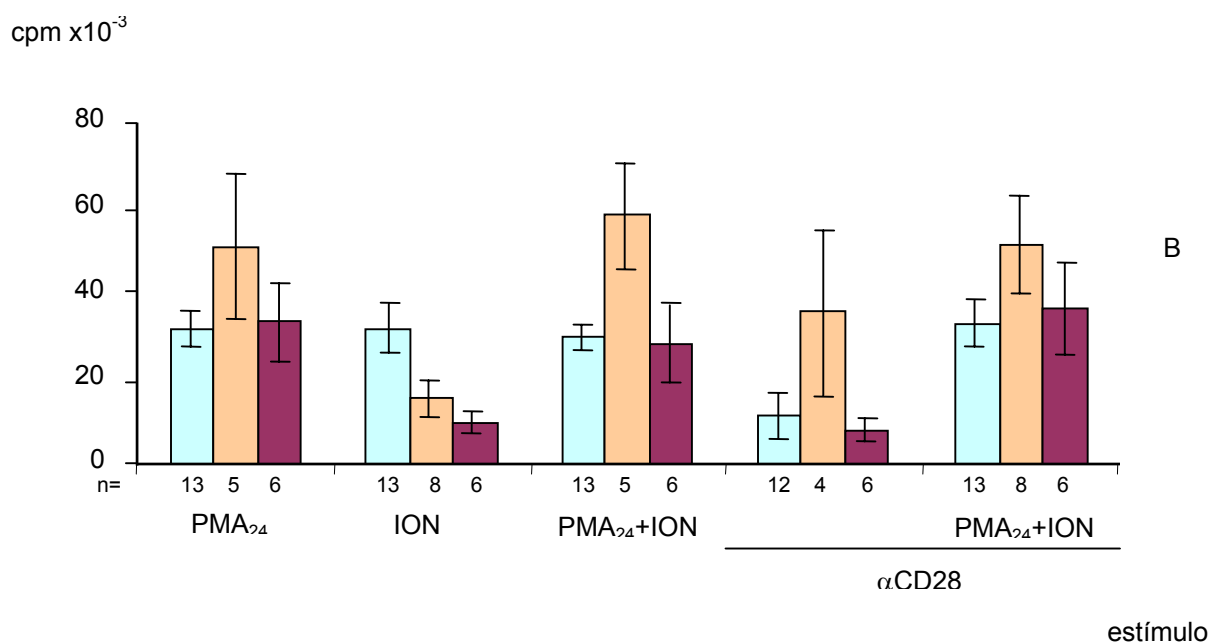
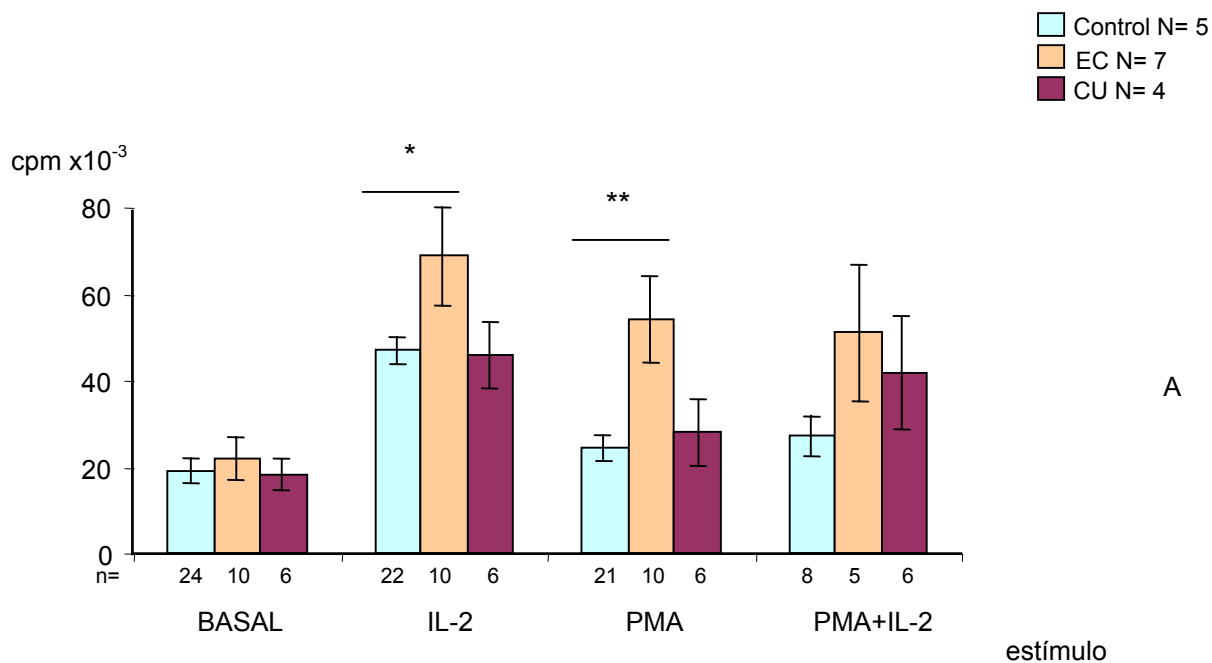
Estímulos de membrana, como IL-2, producen una mayor proliferación en las líneas de pacientes con EC que en líneas de pacientes con CU y en las líneas de individuos sanos, siendo significativa la diferencia entre EC y controles. Otros estímulos más distales con respecto a la membrana, como la PMA, inducen también respuestas significativamente mayores en las líneas de EC que en las líneas control (Figura 4A). La estimulación celular con anticuerpos  $\alpha$ CD3, da lugar a respuestas mucho más elevadas en las líneas procedentes de pacientes con EC, que en las procedentes de pacientes con CU y en individuos control. Esta diferencia se observa tanto al utilizar como estímulo el anticuerpo individualmente, en combinación con IL-2, con PMA, o con anticuerpos  $\alpha$ CD28 o  $\alpha$ CD2 (Figura 2C). Las líneas procedentes de pacientes con EC también alcanzaron cuentas más altas al ser estimuladas vía CD2, con anticuerpo  $\alpha$ CD2 sólo, en combinación con IL-2, con PMA, o con anticuerpo  $\alpha$ CD28 (Figura 4D).

Tabla 10.- Respuesta proliferativa en cuentas por minuto (cpm)  $\times 10^{-3}$  de líneas T-HVS procedentes de CMSP de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal e individuos control.

Estímulo	Control HVS SP N=5		EC HVS SP N=7		CU HVS SP N=4	
		(n)		(n)		(n)
<b>BASAL</b>	19 $\pm$ 3	(24)	22 $\pm$ 5	(10)	18 $\pm$ 3	(6)
<b>IL-2</b>	47 $\pm$ 3	(22)	69 $\pm$ 11 *	(10)	46 $\pm$ 7	(6)
<b>PMA</b>	24 $\pm$ 3	(21)	54 $\pm$ 10 **	(10)	28 $\pm$ 7	(6)
<b><math>\alpha</math>CD3</b>	95 $\pm$ 7	(24)	190 $\pm$ 24 ***	(10)	108 $\pm$ 26	(6)
<b><math>\alpha</math>CD3+IL-2</b>	94 $\pm$ 7	(24)	162 $\pm$ 24 **	(10)	83 $\pm$ 24	(6)
<b><math>\alpha</math>CD3+PMA</b>	49 $\pm$ 6	(24)	146 $\pm$ 20 ***•	(10)	51 $\pm$ 9	(6)
<b><math>\alpha</math>CD3+<math>\alpha</math>CD28</b>	89 $\pm$ 9	(15)	165 $\pm$ 19 * •	(10)	95 $\pm$ 12	(6)
<b><math>\alpha</math>CD3+<math>\alpha</math>CD2</b>	120 $\pm$ 13	(17)	169 $\pm$ 38	(5)	99 $\pm$ 21	(4)
<b><math>\alpha</math>CD2</b>	67 $\pm$ 10	(18)	78 $\pm$ 13	(8)	55 $\pm$ 7	(3)
<b><math>\alpha</math>CD2+IL-2</b>	77 $\pm$ 9	(9)	107 $\pm$ 13	(8)	41 $\pm$ 7	(3)
<b><math>\alpha</math>CD2+PMA</b>	43 $\pm$ 7	(14)	88 $\pm$ 12 *	(8)	59 $\pm$ 9	(3)
<b><math>\alpha</math>CD2+<math>\alpha</math>CD28</b>	65 $\pm$ 8	(16)	80 $\pm$ 15	(8)	52 $\pm$ 2	(3)

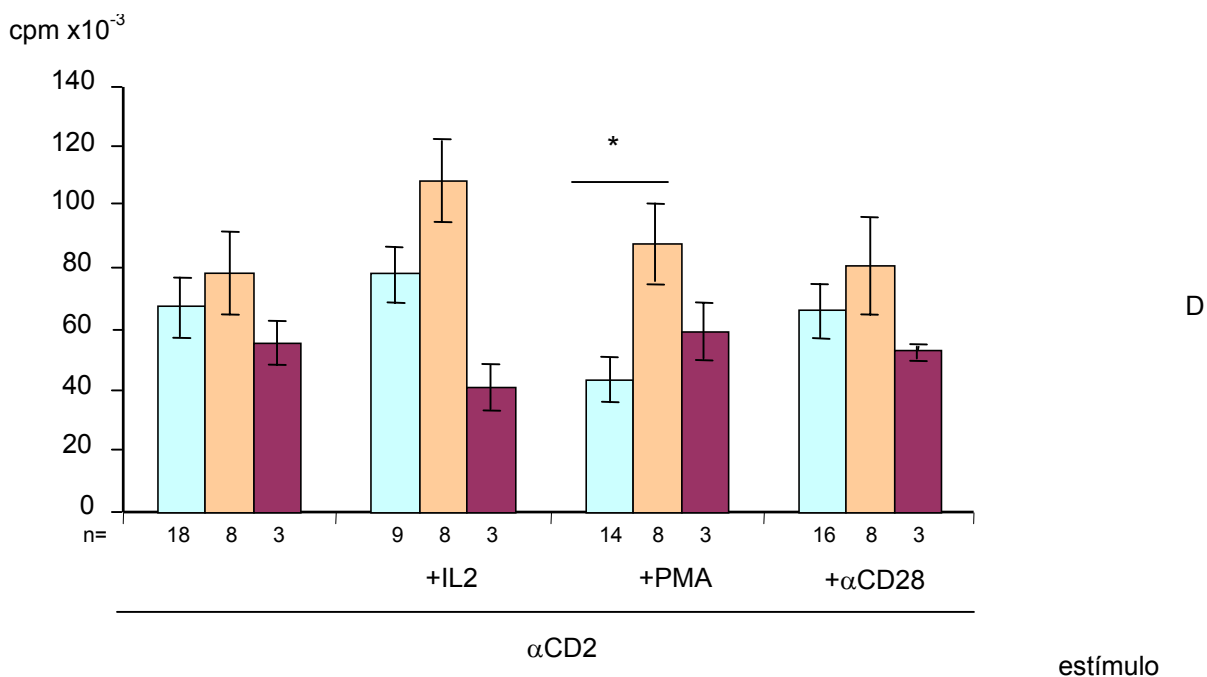
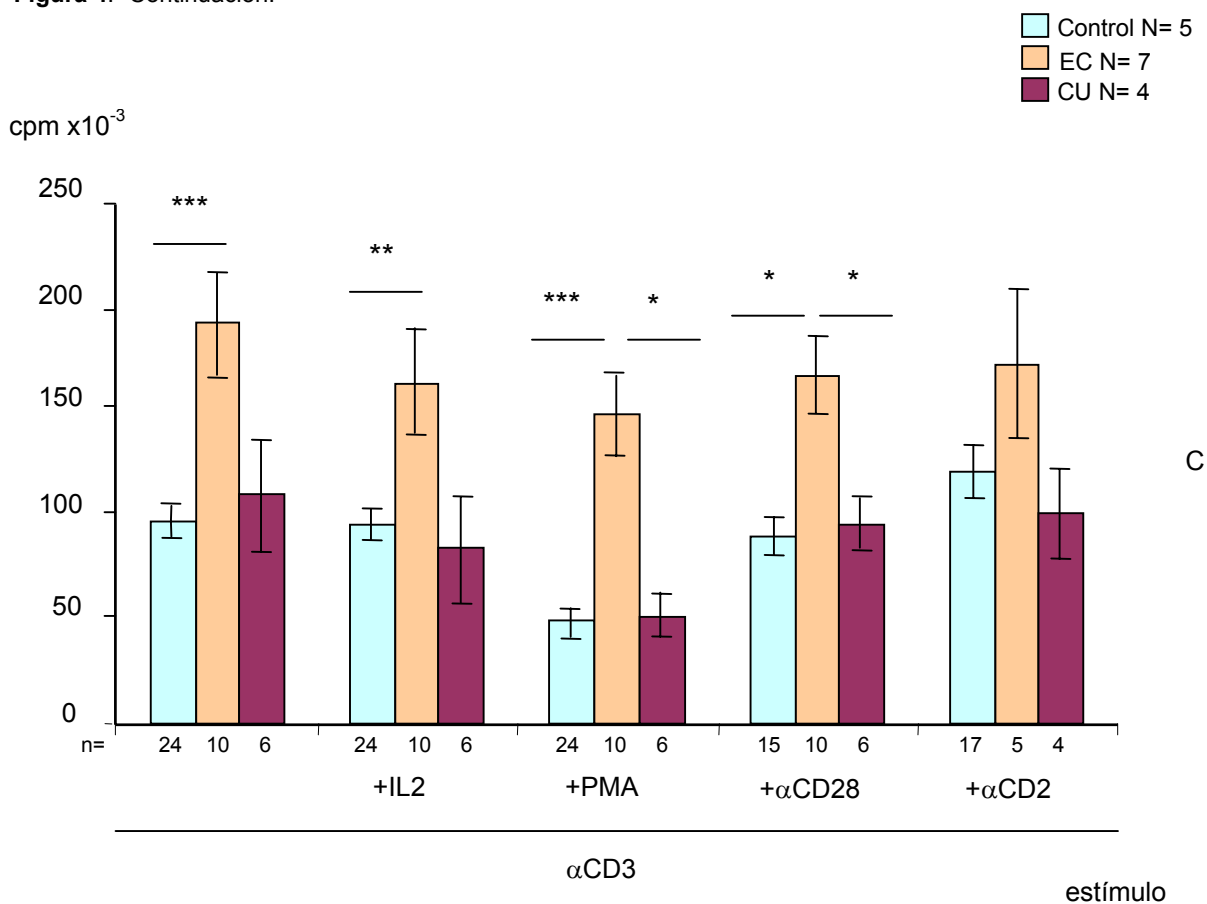
$X \pm SEM$ . (SP) sangre periférica. (N) número de líneas. (n) número de experimentos. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  entre EC y control, •  $p < 0.05$ , entre EC y CU. Se muestran únicamente los resultados más relevantes. Para una lista completa de estímulos ver tabla 4 y figura 4.

**Figura 4.- Respuesta proliferativa en cuentas por minuto (cpm)  $\times 10^{-3}$  de líneas T-HVS procedentes de CMSP de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal e individuos control.**



X $\pm$ SEM. N= número de líneas. n= número de experimentos. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

Figura 4.- Continuación.

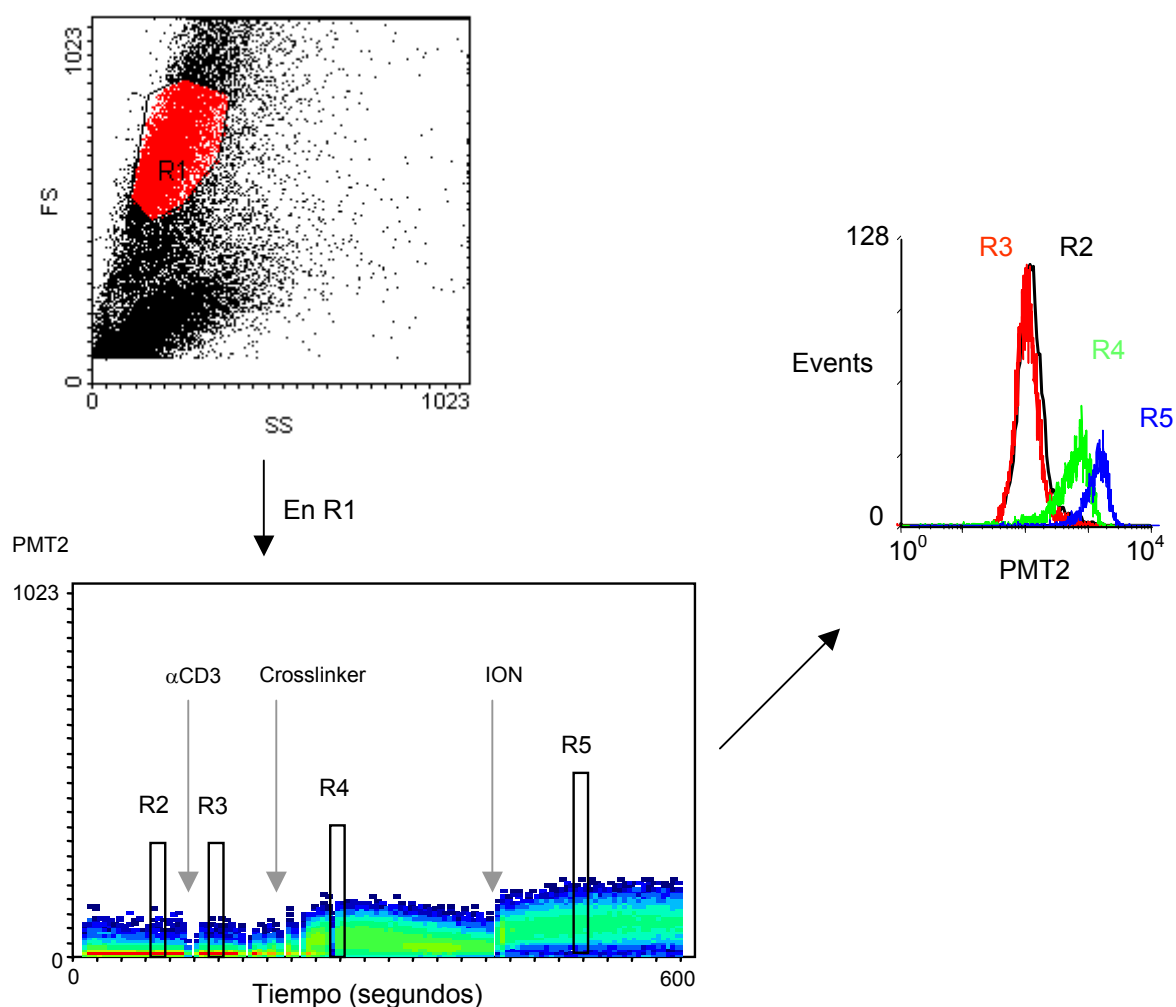


X±SEM. N= número de líneas. n= número de experimentos. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

### 1.2.3.- Estudios de movilización de calcio

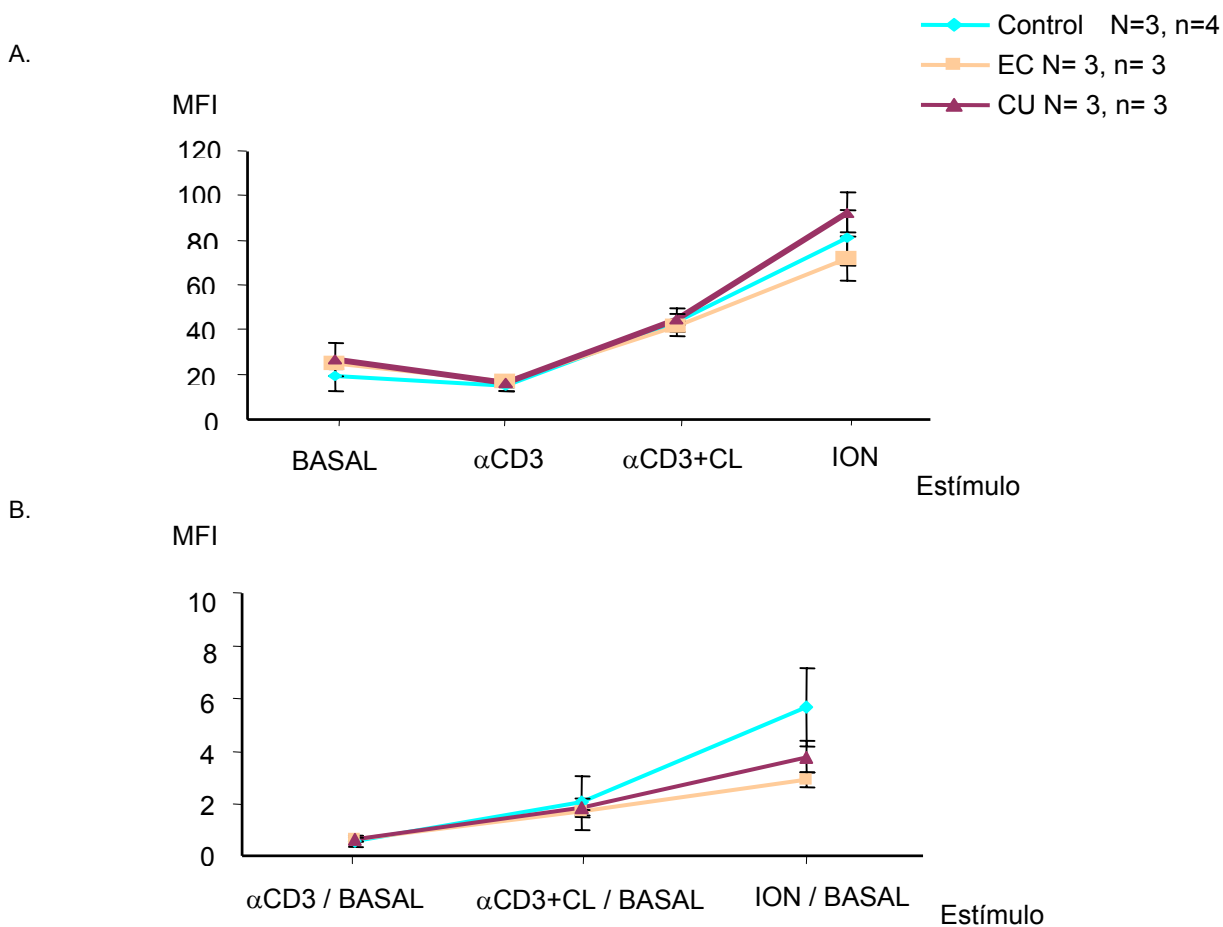
La metodología utilizada permite detectar la cantidad de calcio en el citoplasma de forma basal y tras la adición de diferentes estímulos a distintos tiempos. En el citómetro de flujo se analiza la cantidad de fluorescencia (calcio intracitoplásmico unido a Fluo3AM-FITC) en cada estímulo (Figura 5).

**Figura 5.- Movilización de calcio intracelular en el tiempo, en líneas celulares T HVS, al añadir distintos estímulos. Contenido basal (R2) de calcio citoplásmico y tras la adición de  $\alpha$ CD3 (R3), *crosslinker* (R4) e Ionomicina (R5).**



Los análisis de movilización de calcio en líneas HVS de sangre periférica de individuos sanos y pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal no muestran diferencias significativas entre ambos en cuanto a la respuesta de activación temprana mediante la activación con anticuerpos  $\alpha$ CD3 (Figura 6).

**Figura 6.- Movilización de calcio en líneas T-HVS procedentes de sangre periférica de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal e individuos control.**



A. Cantidad de calcio en el citoplasma celular según la intensidad de fluorescencia media (MFI). B. Ratio entre la cantidad de calcio tras los distintos estímulos y la cantidad basal. N= número de líneas. n= número de experimentos. CL *crosslinker*

## 2.- Estudios en mucosa

### 2.1.- Células mononucleares de mucosa en fresco

#### 2.1.1- Estudio fenotípico

Este trabajo recoge el estudio fenotípico de células mononucleares de *lamina propria* de colon inflamado de 7 pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal (2 pacientes con EC y 5 pacientes con CU) y de zonas sanas de colon de 6 pacientes sometidos a cirugía por razones distintas a esta patología.

#### **Marcadores generales de linaje celular**

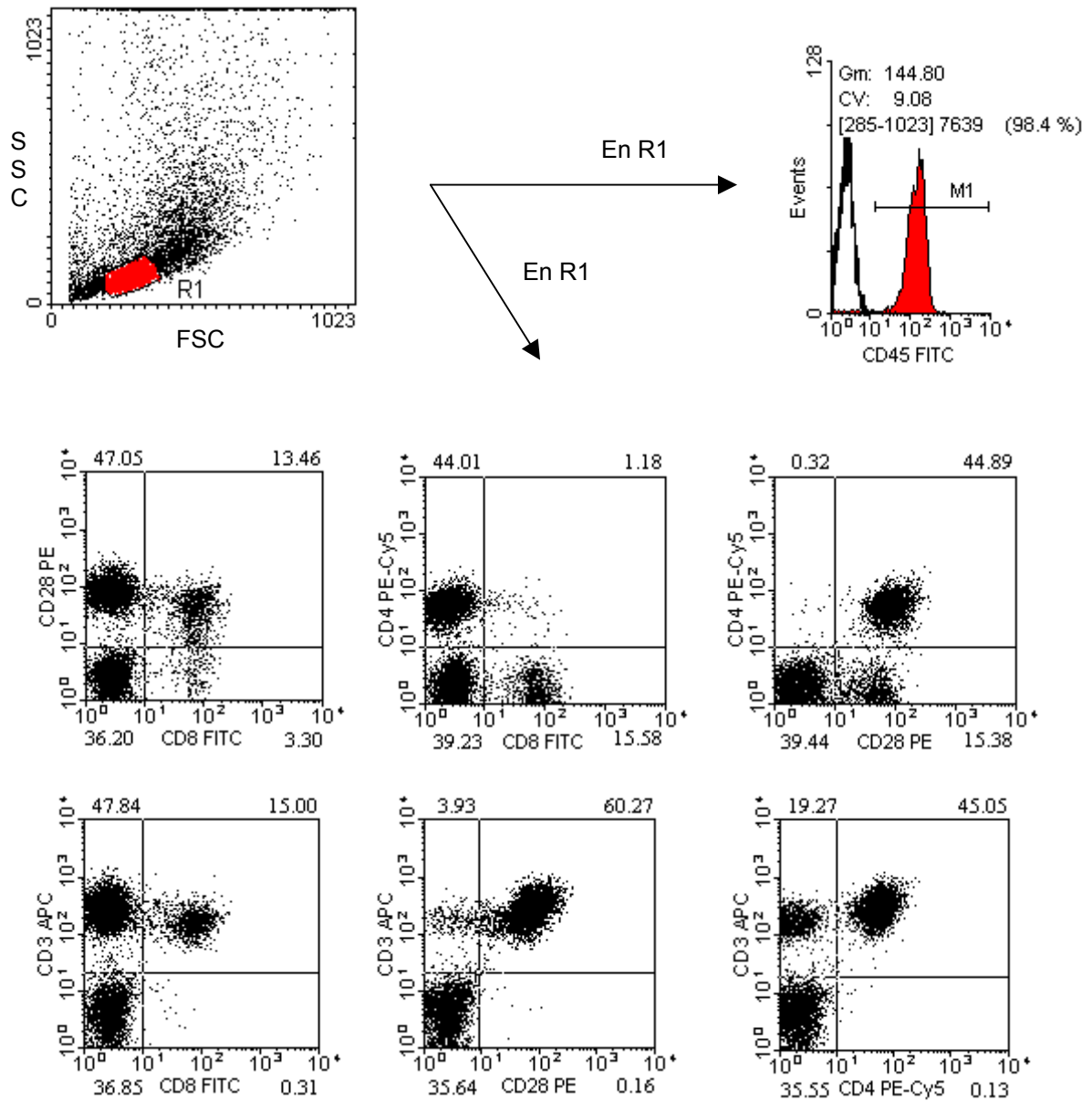
El análisis de los marcadores específicos de linaje de las poblaciones leucocitarias presentes en la *lamina propria* se muestra en la Tabla 11. El porcentaje de leucocitos totales, CD45<sup>+</sup>, en la ventana escogida según tamaño y complejidad celular, es distinto en las tres poblaciones estudiadas (79 ± 4% en controles, 94 ± 1% en EC y 87 ± 9% en CU). Para la comparación del porcentaje de células de cada linaje presente en la mucosa de pacientes con EII y controles, se ha tenido en cuenta la expresión de los marcadores específicos de cada población, únicamente en la población celular CD45<sup>+</sup>.

La proporción de linfocitos T CD3<sup>+</sup> infiltrantes de *lamina propria* es menor en la mucosa de pacientes con Colitis Ulcerosa que en individuos control (64 ± 1% vs 73 ± 2%, respectivamente; p<0.01). El detrimento en el porcentaje de linfocitos T va acompañado por una mayor proporción de linfocitos B, CD19<sup>+</sup>, en la mucosa de pacientes con Colitis Ulcerosa respecto a controles, si bien esta diferencia no alcanza significación estadística (28 ± 3% en CU, 20 ± 3% en controles) (Tabla 11B).

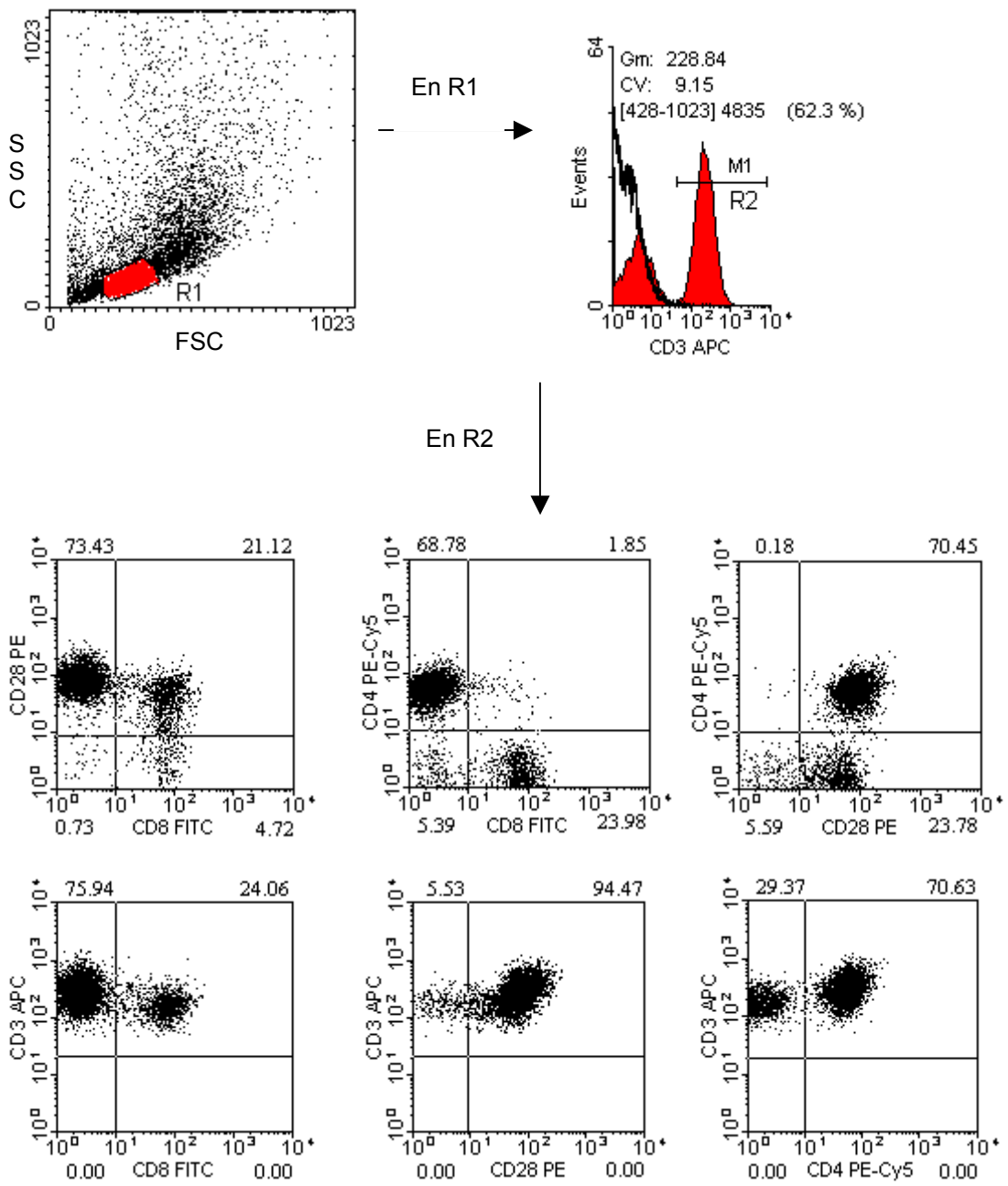
Debido a este menor porcentaje de células CD3<sup>+</sup> en la *lamina propria* de pacientes con CU y controles, el análisis del resto de marcadores se ha realizado dentro de la población CD3<sup>+</sup>. (Figura 7).

Las subpoblaciones de linfocitos T, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, están presentes en distinta proporción en la *lamina propria* de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal y en controles (Tabla 12). El porcentaje de linfocitos T cooperadores, CD4<sup>+</sup>, es menor en pacientes con CU (71 ± 3%) y en pacientes con EC (65 ± 0.3%), que en individuos control, siendo significativa la diferencia entre controles y pacientes con EC (p<0.05). Consecuentemente la proporción de células T CD8<sup>+</sup> es mayor en la mucosa de pacientes que en mucosa control (28 ± 2% en CU, 33 ± 1% en EC y 19 ± 4% en controles).

Figura 7.- Representación de las células obtenidas y analizadas en el citómetro de flujo según tamaño (FSC) y complejidad (SSC). Porcentaje de expresión de distintos marcadores en la ventana de análisis R1, y dentro de las células CD3<sup>+</sup>, R2. Ejemplo de marcaje en superficie con anticuerpos αCD45 FITC por una parte y αCD8 FITC, αCD28 PE, αCD4 PE-Cy5 y αCD3 APC por otra, en células mononucleares de lamina propria.







**Tabla 11.- Porcentaje de expresión de los marcadores específicos de linaje en células mononucleares de *lamina propria* de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal e individuos control.**

A. Porcentaje de expresión de los marcadores en la “ventana” escogida según tamaño y complejidad celular.

<b>Marcador</b>	<b>Control</b>	<b>(n)</b>	<b>EC</b>	<b>(n)</b>	<b>CU</b>	<b>(n)</b>
<b>CD45</b>	79 ± 4	(6)	94 ± 1	(2)	87 ± 9	(5)
<b>CD45RA</b>	3 ± 1	(6)	8 ± 6	(2)	14 ± 4	(5)
<b>CD45RO</b>	55 ± 4	(6)	51 ± 15	(2)	54 ± 8	(5)
<b>CD14</b>	2 ± 1	(6)	1 ± 0	(2)	2 ± 1	(5)
<b>CD16</b>	0.4 ± 0.1	(6)	1 ± 0.3	(2)	1 ± 1	(5)
<b>CD19</b>	15 ± 2	(6)	22 ± 14	(2)	27 ± 2	(5)
<b>CD34</b>	4 ± 1	(6)	1 ± 0.1	(2)	1 ± 1	(5)
<b>CD3</b>	58 ± 4	(6)	70 ± 9	(2)	56 ± 6	(5)
<b>CD4</b>	45 ± 4	(6)	44 ± 4	(2)	43 ± 5	(4)
<b>CD8</b>	13 ± 2	(6)	23 ± 3	(2)	15 ± 7	(4)

B. Porcentaje de expresión de los marcadores, relativo a CD45<sup>+</sup>.

<b>Marcador</b>	<b>Control</b>	<b>(n)</b>	<b>EC</b>	<b>(n)</b>	<b>CU</b>	<b>(n)</b>
<b>CD45</b>	100 ± 0	(6)	100 ± 0	(2)	100 ± 0	(5)
<b>CD45RA</b>	4 ± 1	(4)	8 ± 4	(2)	15 ± 4 *	(6)
<b>CD45RO</b>	70 ± 3	(6)	55 ± 16	(2)	64 ± 5	(6)
<b>CD14</b>	3 ± 1	(6)	2 ± 0	(2)	2 ± 1	(5)
<b>CD16</b>	0.5 ± 0.1	(6)	1 ± 0.3	(2)	1 ± 1	(5)
<b>CD19</b>	20 ± 2	(6)	23 ± 14	(2)	28 ± 2	(5)
<b>CD34</b>	5 ± 1	(6)	1 ± 0.1	(2)	2 ± 1	(5)
<b>CD3</b>	73 ± 2	(6)	75 ± 11	(2)	64 ± 1 *	(5)
<b>CD4</b>	56 ± 3	(6)	47 ± 5	(2)	50 ± 3	(4)
<b>CD8</b>	16 ± 2	(6)	25 ± 3	(2)	17 ± 7	(4)

X± SEM. (n) número de muestras. \*p<0.01 respecto a controles.

En la población de linfocitos T CD3<sup>+</sup> no existen diferencias significativas en la expresión de los marcadores CD45RA y CD45RO entre pacientes y controles (Tabla 12). Sin embargo, al estudiar la expresión de estos marcadores en el total de leucocitos, CD45<sup>+</sup>, se observa que existe una mayor expresión de CD45RA en pacientes con Colitis Ulcerosa (15 ± 4%) que en controles (4 ± 1%; p<0.05 respecto a CU) (Tabla 11). El porcentaje de células CD45RO<sup>+</sup> en los leucocitos de *lamina propria* de

pacientes con CU se encuentra disminuido en pacientes respecto a controles, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa (Tabla 11). En mucosa de pacientes con EC se observa la misma tendencia que en pacientes con CU, pero de manera menos acusada.

**Tabla 12.- Porcentaje de expresión de CD3, CD4, CD8, CD45RA y CD45RO en la población CD3<sup>+</sup> de lamina propia de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal e individuos control.**

<b>Marcador</b>	<b>Control</b>	<b>(n)</b>	<b>EC</b>	<b>(n)</b>	<b>CU</b>	<b>(n)</b>
<b>CD3</b>	100 ± 0	(6)	100 ± 0	(2)	100 ± 0	(5)
<b>CD4</b>	80 ± 3	(6)	65 ± 0.3 *	(2)	71 ± 3	(4)
<b>CD8</b>	19 ± 4	(6)	33 ± 1	(2)	28 ± 2	(4)
<b>CD45RA</b>	1 ± 0.5	(4)	3 ± 2	(2)	3 ± 1	(6)
<b>CD45RO</b>	88 ± 4	(6)	69 ± 8	(2)	86 ± 6	(6)
<b>CD45RA<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup></b>	3	(1)	1 ± 1	(2)	1 ± 1	(2)
<b>CD45RO<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup></b>	70	(1)	50 ± 3	(2)	55 ± 6	(3)

X ± SEM. (n) número de muestras. \* p<0.05 respecto a controles.

#### **Marcadores de activación (CD25 y HLA-DR)**

La cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2, CD25, se expresa en menor porcentaje en los linfocitos T de lamina propia de los pacientes con Enfermedad de Crohn estudiados que en los individuos control (15 ± 1% y 53 ± 6%, respectivamente; p<0.05). La disminución corresponde tanto a células T CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (17 ± 3% en EC vs 37% en controles), o CD25<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (17 ± 2% en EC vs 47% en controles; p<0.05), como a células CD25<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (1 ± 0% en EC vs 7 ± 2% en controles), aunque no se trate de una diferencia estadísticamente significativa en el último caso (Tabla 13).

El análisis de la expresión en superficie del marcador CD25 también muestra que existe mayor porcentaje de células T CD25<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> en la mucosa de pacientes con Enfermedad de Crohn (33 ± 1%), que en controles (11 ± 3%; p<0.05). Por tanto, el mayor porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Tabla 12), consiste en una mayor proporción de células que no expresan este marcador de activación. Lo mismo ocurre en el caso de pacientes con CU, aunque debido a la gran variabilidad en los resultados obtenidos, no se alcanza significación estadística.

Por lo que respecta a la expresión de HLA-DR en los linfocitos T de lamina propia, existe una gran variabilidad, tanto en pacientes con EII como en controles. El porcentaje de células CD3<sup>+</sup> que son HLA-DR<sup>+</sup> es menor en pacientes con EC (7 ± 2%) que en pacientes con CU (27 ± 8%) y en controles (25 ± 5%), aunque no de manera estadísticamente significativa, debido a dicha variabilidad (Tabla 13). La menor expresión de HLA-DR se da tanto en linfocitos T CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>. Esto indica que el mayor porcentaje de células CD8<sup>+</sup> encontrado en EC (Tabla 12), no expresa HLA-DR. Así, el

porcentaje de células HLA-DR<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> es mayor, significativamente, en *lamina propria* de pacientes con EC ( $29 \pm 1\%$ ) que en controles ( $6 \pm 1\%$ ;  $p < 0.001$ ) o en pacientes con CU ( $14 \pm 3\%$ ;  $p < 0.05$ ). En pacientes con Colitis Ulcerosa, ocurre lo mismo pero en menor grado (correspondiente al menor aumento de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en CU) y existe un mayor porcentaje de células HLA-DR<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> ( $14 \pm 3\%$ ) que en controles ( $6 \pm 1\%$ ;  $p < 0.05$ ).

**Tabla 13.- Porcentaje de expresión de CD25 y HLA-DR, totales y con CD4 y CD8, en la población CD3<sup>+</sup> de *lamina propria* de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal e individuos control.**

<b>Marcador</b>	<b>Control</b>	<b>(n)</b>	<b>EC</b>	<b>(n)</b>	<b>CU</b>	<b>(n)</b>
<b>CD25</b>	53 ± 6	(6)	15 ± 1 **	(2)	43 ± 15	(4)
<b>CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup></b>	37	(1)	17 ± 3	(2)	26 ± 7	(3)
<b>CD25<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup></b>	4	(1)	1 ± 0.2	(2)	3 ± 1	(3)
<b>CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup></b>	61	(1)	48 ± 2	(2)	45 ± 4	(3)
<b>CD25<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup></b>	7 ± 2	(6)	1 ± 0	(2)	9 ± 5	(4)
<b>CD25<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup></b>	47 ± 6	(6)	17 ± 2 *	(2)	31 ± 8	(4)
<b>CD25<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup></b>	11 ± 3	(6)	33 ± 1 *	(2)	20 ± 6	(4)
<b>HLA-DR</b>	25 ± 5	(4)	7 ± 2	(2)	27 ± 8	(4)
<b>HLA-DR<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup></b>	15 ± 4	(4)	3 ± 2	(2)	13 ± 4	(3)
<b>HLA-DR<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup></b>	11 ± 4	(4)	5 ± 1	(2)	13 ± 4	(3)
<b>HLA-DR<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup></b>	65 ± 3	(4)	62 ± 1	(2)	64 ± 9	(3)
<b>HLA-DR<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup></b>	11 ± 3	(4)	4 ± 1	(2)	14 ± 3	(3)
<b>HLA-DR<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup></b>	17 ± 6	(4)	3 ± 2	(2)	13 ± 4	(3)
<b>HLA-DR<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup></b>	6 ± 1	(4)	29 ± 1 ***•	(2)	14 ± 3 *	(3)

X ± SEM. (n) número de muestras. \*  $p < 0.05$  respecto a controles. \*\*  $p < 0.01$  respecto a controles.

•  $p < 0.05$  respecto a CU.

### **Moléculas coestimuladoras (CD28, CD80 y CD86) y CD103**

No se han encontrado diferencias en el porcentaje de linfocitos T CD28<sup>+</sup> entre pacientes y controles (Tabla 14). Sin embargo, al examinar la expresión de CD28 en poblaciones CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, se puede observar que, tanto en EC como CU, la proporción de células CD28<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> está aumentada significativamente respecto a controles ( $24 \pm 1\%$  en EC,  $21 \pm 1\%$  en CU;  $p < 0.05$  respectivamente frente a controles,  $12 \pm 2\%$  en controles). Por otra parte, el porcentaje de células CD28<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (CD28<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) se encuentra disminuido en los pacientes con EC respecto a controles, de manera

estadísticamente significativa ( $64 \pm 1\%$  en EC vs  $81 \pm 3\%$  en controles;  $p < 0.05$ ). Esta disminución se debe al menor porcentaje de células  $CD4^+$  existente en estos pacientes (Tabla 12), ya que apenas existen células  $CD28^-CD4^+$ . El mayor porcentaje de linfocitos T  $CD8^+$ , en este caso, corresponde a células  $CD28^+$  y, en pacientes con EC también a células  $CD28^-$ .

**Tabla 14.- Porcentaje de expresión de CD28, CD80, CD86 y CD103, totales y con CD4 y CD8, en la población  $CD3^+$  de lamina propria de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal e individuos control.**

Marcador	Control	(n)	EC	(n)	CU	(n)
CD28	$93 \pm 2$	(6)	$88 \pm 2$	(2)	$91 \pm 2$	(4)
CD28 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	88	(1)	$64 \pm 1$	(2)	$71 \pm 6$	(3)
CD28 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup>	8	(1)	$24 \pm 2$	(2)	$21 \pm 3$	(3)
CD28 <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup>	1	(1)	$0.4 \pm 0.3$	(2)	$2 \pm 2$	(3)
CD28 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	$12 \pm 2$	(6)	$24 \pm 1^*$	(2)	$21 \pm 1^*$	(4)
CD28 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	$81 \pm 3$	(6)	$64 \pm 1^*$	(2)	$70 \pm 4$	(4)
CD28 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	$5 \pm 2$	(6)	$10 \pm 2$	(2)	$6 \pm 1$	(4)
CD80	$1 \pm 0.2$	(5)	$1 \pm 0.5$	(2)	$2 \pm 0.3^*$	(4)
CD80 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	0.3	(1)	$1 \pm 0.4$	(2)	$1 \pm 0.5$	(3)
CD80 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup>	0	(1)	$0.2 \pm 0.1$	(2)	$0.4 \pm 0.2$	(3)
CD80 <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup>	87	(1)	$63 \pm 1$	(2)	$71 \pm 3$	(3)
CD80 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	$0.2 \pm 0.1$	(5)	$0.3 \pm 0.1$	(2)	$1 \pm 0.5$	(4)
CD80 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	$1 \pm 0.1$	(5)	$1 \pm 0.5$	(2)	$1 \pm 0.4$	(4)
CD80 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	$18 \pm 4$	(5)	$34 \pm 2$	(2)	$27 \pm 2$	(4)
CD86	$19 \pm 8$	(6)	$4 \pm 1 \bullet$	(2)	$14 \pm 2$	(4)
CD86 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	$7 \pm 3$	(6)	$1 \pm 0.1 \bullet$	(2)	$6 \pm 1$	(3)
CD86 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	$12 \pm 6$	(6)	$4 \pm 1$	(2)	$5 \pm 1$	(3)
CD86 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	$13 \pm 4$	(6)	$33 \pm 1^*$	(2)	$23 \pm 3$	(3)
CD103	$10 \pm 1$	(5)	$10 \pm 5$	(2)	$10 \pm 2$	(4)
CD103 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	8	(1)	$5 \pm 1$	(2)	$3 \pm 1$	(3)
CD103 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	$6 \pm 1$	(5)	$7 \pm 5$	(2)	$7 \pm 2$	(4)

X  $\pm$  SEM. (n) número de muestras. \*  $p < 0.05$  respecto a controles.  $\bullet p < 0.05$  respecto a CU.

La expresión de la molécula B7.1, CD80, en células de *lamina propria* es muy baja tanto en pacientes como en controles (Tabla 14). El porcentaje de linfocitos T CD80<sup>+</sup>, si embargo, es significativamente mayor en pacientes con CU ( $2 \pm 0.3\%$ ) que en controles ( $1 \pm 0.2\%$ ;  $p < 0.01$ ).

En cuanto a la molécula B7.2, CD86, su expresión es mayor en linfocitos T de mucosa que la de CD80 (Tabla 14). Existe un menor porcentaje de linfocitos T CD86<sup>+</sup> en mucosa de pacientes con EC ( $4 \pm 1\%$ ) que en pacientes con Colitis Ulcerosa ( $14 \pm 2\%$ ;  $p < 0.05$ ) y en controles ( $7 \pm 3\%$ ), aunque no estadísticamente significativo. En *lamina propria* de controles, la expresión de CD86 es muy variable aunque, en general, se asemeja más a la encontrada en pacientes con CU.

Según los resultados obtenidos sobre la expresión de las moléculas B7.1 y B7.2 en linfocitos T, el mayor porcentaje de células CD8<sup>+</sup> encontrado en pacientes con EC (Tabla 12), corresponde a células que no expresan ninguno de los dos marcadores, con lo cual el porcentaje de células CD80<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> y CD86<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> es mayor en pacientes con EC que en controles, de forma estadísticamente significativa en el caso de CD86 ( $33 \pm 1\%$  en EC vs  $13 \pm 4\%$  en controles;  $p < 0.05$ ).

No se encuentran diferencias en el porcentaje de linfocitos T CD103<sup>+</sup> presente en *lamina propria* de pacientes con EC, CU e individuos control (Tabla 14). La expresión de esta integrina en linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> tampoco difiere significativamente entre linfocitos T de *lamina propria* de pacientes y controles.

## 2.2.- Líneas celulares T-HVS de mucosa

Tras la infección con HVS de las células obtenidas de 19 biopsias procedentes de pacientes con EC, 11 de pacientes con CU, y 7 de individuos control, se obtuvo 1 línea T-HVS de EC, 4 líneas CU y 2 líneas control. Estos datos representan un porcentaje de infección de 6% en linfocitos T de mucosa de pacientes con EC, 36% en pacientes con CU y un 29% en controles.

Las líneas celulares se han obtenido tanto de muestras en estado leve de la enfermedad como moderado o severo, sin que se observen diferencias en el fenotipo ni en la capacidad proliferativa de las líneas. Otros autores han descrito que la localización o la duración de la enfermedad, la presencia de inflamación, actividad clínica, o el tratamiento de los pacientes es independiente del comportamiento de las células T de mucosa de los pacientes con EII o de los marcadores de superficie (Kugathasan *et al* 1998, Ina *et al* 1999).

### 2.2.1- Estudio fenotípico

Al infectar células de mucosa con HVS se han obtenido tanto líneas CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, contrastando con la infección de linfocitos de sangre periférica que dio lugar en todos los casos a líneas CD8<sup>+</sup>. La línea procedente de un paciente con EC y el 50% de las líneas obtenidas de pacientes con CU y controles presenta fenotipo CD4<sup>+</sup>, y el otro 50% CD8<sup>+</sup>. Todas las líneas T HVS de mucosa presentan el fenotipo de activación característico también de las líneas de sangre periférica. Los resultados de las líneas CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se presentan y se analizan por separado debido a que existen diferencias fenotípicas y funcionales entre ellas (Tabla 15).

**Tabla 15.- Porcentaje de expresión de marcadores específicos de linaje en líneas celulares T-HVS de mucosa procedentes de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal e individuos control.**

A. Líneas CD4<sup>+</sup>

Marcador	Control CD4 <sup>+</sup> HVS mucosa N=1	(n)	CU CD4 <sup>+</sup> HVS mucosa N=2	(n)
CD45	100 ± 0.1	(3)	98 ± 1	(4)
CD56	33	(1)	12 ± 5	(3)
CD2	95 ± 1	(2)	98 ± 1	(3)
CD3	99 ± 0.4	(3)	99 ± 0.3	(4)
CD4	90 ± 4	(3)	94 ± 1	(4)
CD8	3 ± 1	(3)	4 ± 1	(4)
TcRγδ	0.1	(1)	1 ± 0.5	(2)
CD45RA	1 ± 0.2	(2)	5 ± 2	(4)
CD45RO	70 ± 15	(2)	87 ± 5	(4)

Tabla 15.- A. Líneas CD4<sup>+</sup>. Continuación

Marcador	Control CD4 <sup>+</sup> HVS mucosa N=1		CU CD4 <sup>+</sup> HVS mucosa N=2	
		(n)		(n)
CD25	84 ± 2	(3)	74 ± 9	(4)
CD26	94 ± 3	(3)	99 ± 1	(4)
CD28	2 ± 0	(3)	7 ± 2	(4)
CD80	39	(1)	42 ± 10	(4)
CD86	73 ± 5	(3)	94 ± 2 *	(4)
HLA-DR	97 ± 0.1	(2)	99 ± 1	(4)

B. Líneas CD8<sup>+</sup>

Marcador	Control CD8 <sup>+</sup> HVS mucosa N=1		EC CD8 <sup>+</sup> HVS mucosa N=1		CU CD8 <sup>+</sup> HVS mucosa N=2	
		(n)		(n)		(n)
CD45	100 ± 0.1	(4)	100 ± 0	(2)	100 ± 0	(4)
CD56	31 ± 3	(2)			59 ± 7	(2)
CD2	92 ± 7	(3)	93 ± 1	(2)	96 ± 3	(4)
CD3	99 ± 0.3	(5)	100 ± 0.1	(3)	99 ± 0.4	(5)
CD4	1 ± 0.3	(5)	0.5 ± 0.3	(2)	1 ± 0.5	(5)
CD8	92 ± 4	(5)	99 ± 0.2	(2)	97 ± 1	(4)
CD45RA	5 ± 3	(3)	5 ± 0.3 •	(2)	1 ± 0.4	(2)
CD45RO	91 ± 0.4	(2)	90 ± 5	(2)	68 ± 15	(2)
CD25	43 ± 1	(2)	48 ± 16	(2)	40 ± 10	(5)
CD26	99	(1)	94	(1)	93	(1)
CD28	1 ± 1	(4)	3 ± 2	(2)	1 ± 0.5	(5)
CD80	15 ± 11	(4)	31 ± 22	(2)	8 ± 6	(5)
CD86	12 ± 7	(4)	30 ± 20	(2)	49 ± 13 *	(3)
HLA-DR	97 ± 1	(2)	98 ± 0.3	(2)	94 ± 5	(4)

X±SEM. (N) número de líneas. (n) número de experimentos. \*p<0.05 respecto a controles. •p<0.05 respecto a CU.



### 2.2.2.- Estudios de proliferación celular

La capacidad proliferativa de las líneas HVS de mucosa es diferente entre pacientes con Enfermedad de Crohn, Colitis Ulcerosa e individuos control, en respuesta a determinados estímulos (Tabla 15) (Figuras 8 y 9). Las líneas CD4<sup>+</sup> procedentes de pacientes con Colitis Ulcerosa responden de forma significativamente superior ante el estímulo PMA+Ionomicina ( $52 \pm 7$  cpmx10<sup>-3</sup>) que las líneas control ( $20 \pm 3$  cpmx10<sup>-3</sup>; p<0.01). Diferencias que no se observan basalmente, en respuesta a IL-2, a PMA o a Ionomicina por separado.

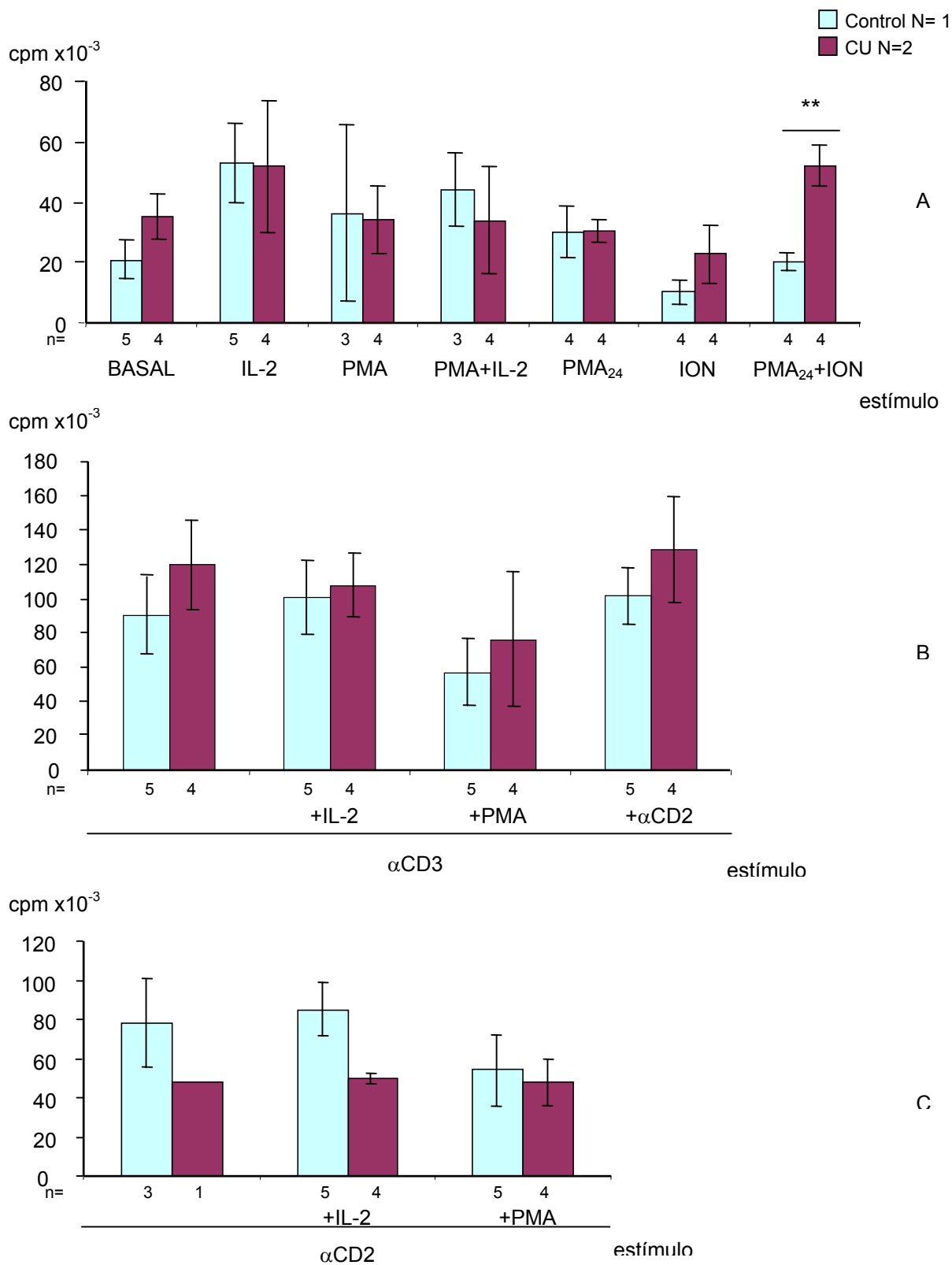
La estimulación vía CD3 de las líneas CD4<sup>+</sup> de mucosa de pacientes con CU da lugar a una proliferación celular similar a la de líneas control (Figura 8B). Al estimular con anticuerpos  $\alpha$ CD2, individualmente o en combinación con IL-2 o PMA, las líneas de pacientes responden en menor medida que las líneas control, aunque la diferencia entre ambas no es estadísticamente significativa (Figura 8C).

Las líneas CD8<sup>+</sup> procedentes de pacientes con Enfermedad de Crohn presentan mayor capacidad de proliferación a Ionomicina ( $28 \pm 4$  cpmx10<sup>-3</sup>) que las líneas control ( $7 \pm 2$  cpmx10<sup>-3</sup>; p<0.001) (Figura 3A). Tanto las líneas CD8<sup>+</sup> procedentes de mucosa de pacientes con EC ( $188 \pm 24$  cpmx10<sup>-3</sup>) como con CU ( $182 \pm 26$  cpmx10<sup>-3</sup>) responden de manera significativamente mayor a la estimulación con  $\alpha$ CD3 que las líneas control ( $101 \pm 14$  cpmx10<sup>-3</sup>; p<0.05 respecto a EC y p<0.01 respecto a CU). Al añadir a los anticuerpos  $\alpha$ CD3 otras sustancias mitogénicas como IL-2, PMA o  $\alpha$ CD2 la respuesta de las líneas de pacientes sigue siendo mayor que las de controles (Figura 9B), de forma estadísticamente significativa en las líneas procedentes de pacientes con CU en respuesta a CD3+IL-2 ( $167 \pm 19$  cpmx10<sup>-3</sup> en CU vs  $103 \pm 14$  cpmx10<sup>-3</sup> en controles; p<0.05).

La respuesta de las líneas CD8<sup>+</sup>, al contrario que la de las líneas CD4<sup>+</sup> es similar o mayor en líneas de pacientes que en las líneas control (Figura 9C). Al combinar anticuerpos  $\alpha$ CD2 con PMA, la respuesta obtenida en líneas CD8<sup>+</sup> EC ( $116 \pm 10$  cpmx10<sup>-3</sup>) es significativamente mayor que en líneas control ( $48 \pm 10$  cpmx10<sup>-3</sup>; p<0.01).

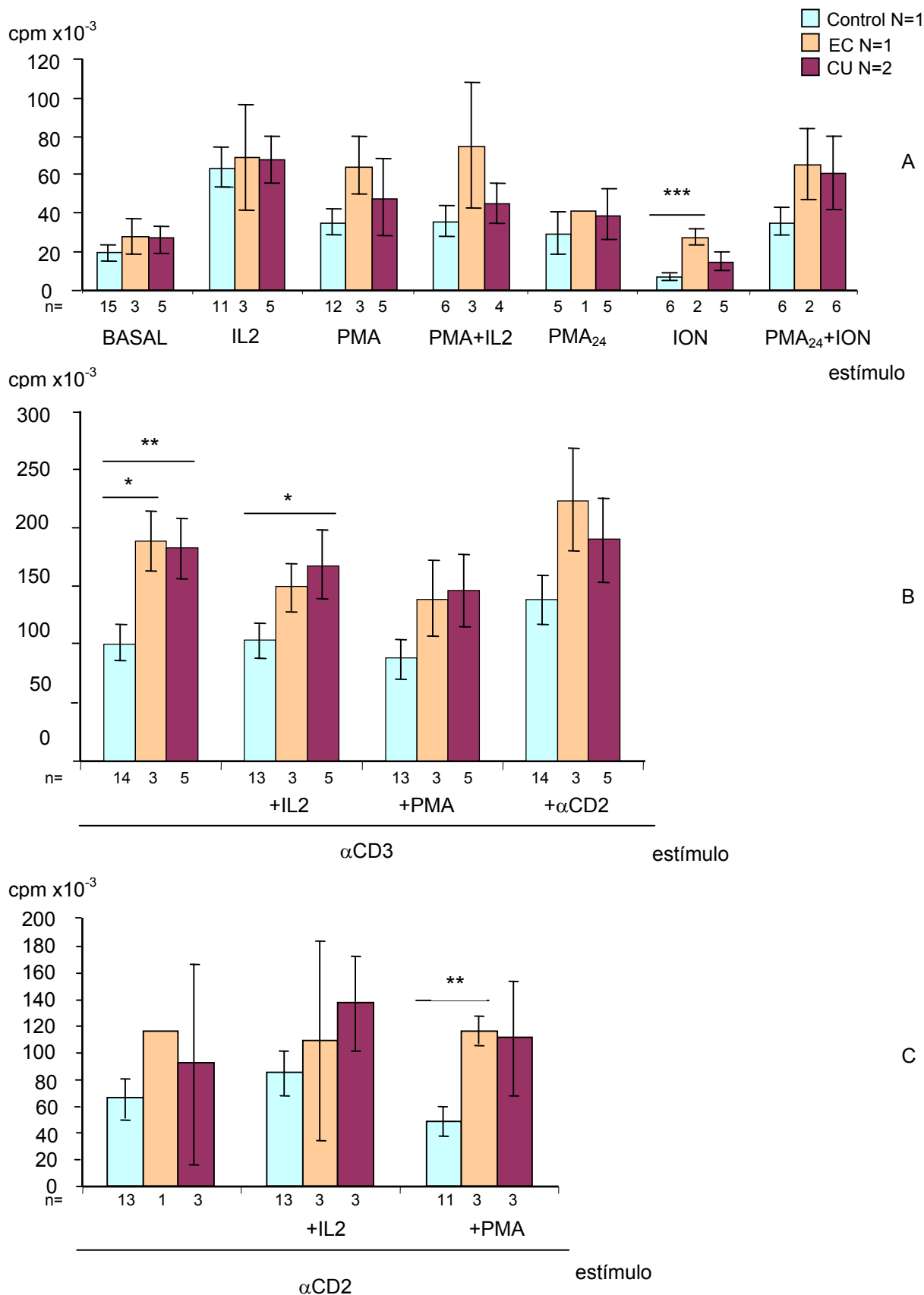
En las líneas HVS CD8<sup>+</sup> procedentes de mucosa no se observan las diferencias en el comportamiento proliferativo encontradas entre las líneas de sangre periférica, CD8<sup>+</sup>, de pacientes con Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa.

**Figura 8.- Respuesta proliferativa en cuentas por minuto (cpm)  $\times 10^{-3}$  de líneas T-HVS de mucosa  $CD4^+$  procedentes de pacientes con Colitis Ulcerosa e individuos control.**



X $\pm$ SEM. N= número de líneas. n= número de experimentos. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

**Figura 9.- Respuesta proliferativa en cuentas por minuto (cpm)  $\times 10^{-3}$  de líneas T-HVS de mucosa CD8<sup>+</sup> procedentes de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal e individuos control.**



X $\pm$ SEM. N= número de líneas. n= número de experimentos. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

Tabla 16.- Proliferación celular en  $\text{cmpx}10^{-3}$  de líneas celulares T-HVS de mucosa procedentes de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal e individuos control.

A. Líneas CD4<sup>+</sup>

Estímulo	Control CD4 <sup>+</sup> HVS mucosa N=1		CU CD4 <sup>+</sup> HVS mucosa N=2	
		(n)		(n)
<b>BASAL</b>	21 ± 6	(5)	35 ± 7	(4)
<b>IL-2</b>	53 ± 13	(5)	52 ± 22	(4)
<b>PMA</b>	36 ± 30	(3)	34 ± 11	(4)
<b>PMA+IL-2</b>	44 ± 12	(3)	34 ± 18	(4)
<b>PMA<sub>24</sub></b>	30 ± 8	(4)	30 ± 4	(4)
<b>ION</b>	10 ± 4	(4)	23 ± 9	(4)
<b>PMA<sub>24</sub>+ION</b>	20 ± 3	(4)	52 ± 7 **	(4)
<b>αCD3</b>	90 ± 23	(5)	120 ± 26	(4)
<b>αCD3+IL-2</b>	101 ± 21	(5)	108 ± 18	(4)
<b>αCD3+PMA</b>	57 ± 20	(5)	76 ± 39	(4)
<b>αCD3+αCD2</b>	101 ± 16	(5)	128 ± 31	(4)
<b>αCD2</b>	78 ± 22	(5)	48	(1)
<b>αCD2+IL-2</b>	85 ± 13	(5)	50 ± 2	(4)
<b>αCD2+PMA</b>	54 ± 18	(5)	48 ± 11	(4)

B. Líneas CD8<sup>+</sup>

Estímulo	Control CD8 <sup>+</sup> HVS mucosa N=1		EC CD8 <sup>+</sup> HVS mucosa N=1		CU CD8 <sup>+</sup> HVS mucosa N=2	
		(n)		(n)		(n)
<b>BASAL</b>	20 ± 4	(15)	28 ± 9	(3)	28 ± 8	(5)
<b>IL-2</b>	64 ± 11	(11)	70 ± 29	(3)	68 ± 12	(5)
<b>PMA</b>	35 ± 6	(12)	64 ± 10	(3)	48 ± 20	(5)
<b>PMA+IL-2</b>	36 ± 7	(7)	75 ± 32	(3)	45 ± 10	(4)
<b>PMA<sub>24</sub></b>	29 ± 11	(5)	41	(1)	39 ± 13	(5)
<b>ION</b>	7 ± 2	(6)	28 ± 4 ***	(2)	15 ± 5	(5)
<b>PMA<sub>24</sub>+ION</b>	35 ± 7	(6)	66 ± 18	(2)	61 ± 19	(6)
<b>αCD3</b>	100 ± 14	(14)	189 ± 24 *	(3)	182 ± 26 **	(6)
<b>αCD3+IL-2</b>	102 ± 14	(13)	149 ± 21	(3)	167 ± 28 *	(6)
<b>αCD3+PMA</b>	88 ± 16	(13)	139 ± 32	(3)	145 ± 31	(5)
<b>αCD3+αCD2</b>	138 ± 21	(14)	224 ± 43	(3)	19 ± 35	(5)
<b>αCD2</b>	66 ± 14	(13)	116	(1)	92 ± 75	(3)
<b>αCD2+IL-2</b>	85 ± 16	(13)	108 ± 74	(3)	137 ± 35	(3)
<b>αCD2+PMA</b>	48 ± 10	(11)	116 ± 10 **	(3)	119 ± 43 *	(3)

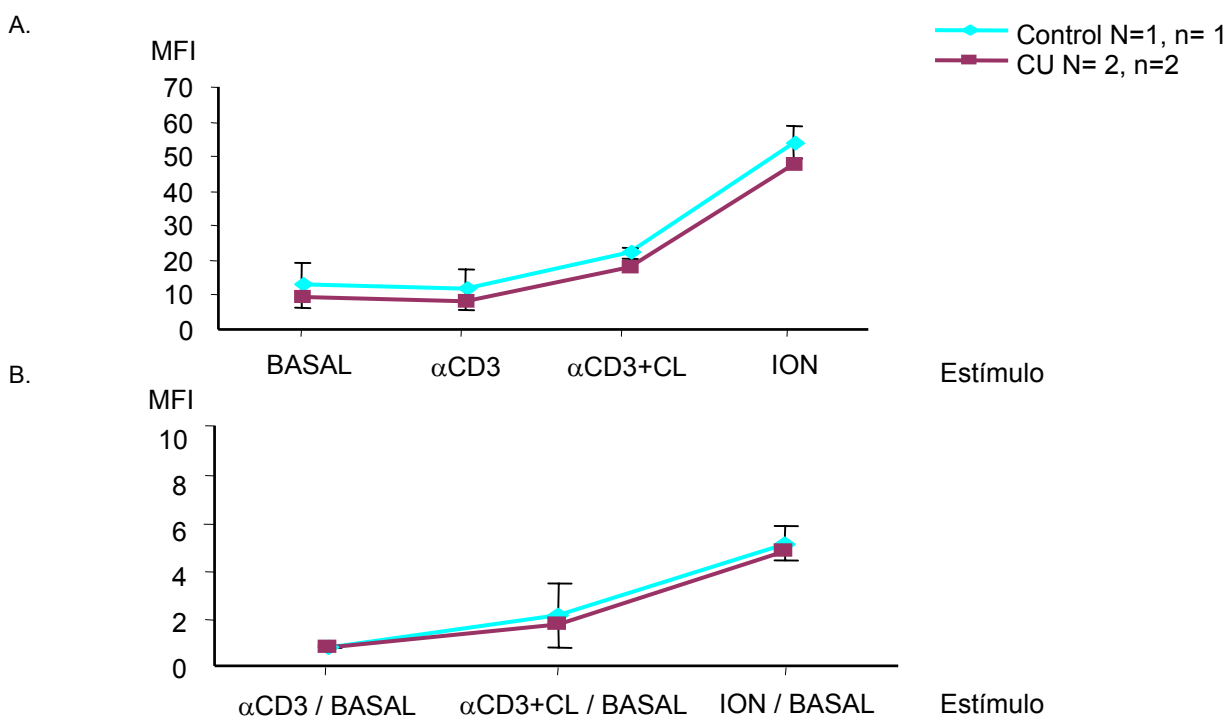
X±SEM. (N) número de líneas. (n) número de experimentos. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 respecto a control.

### 2.2.3.- Estudios de movilización de calcio

Las líneas HVS CD4<sup>+</sup> de mucosa analizadas, líneas control y procedentes de pacientes con CU, se comportan de manera similar en cuanto a movilización de calcio tras la estimulación vía CD3 (Figura 10). No existen diferencias entre la cantidad de calcio en el citoplasma en condiciones basales ni tras estimulación con  $\alpha$ CD3,  $\alpha$ CD3+*crosslinker* o con Ionomicina (liberación total de calcio al citoplasma) entre líneas control y líneas de pacientes con CU.

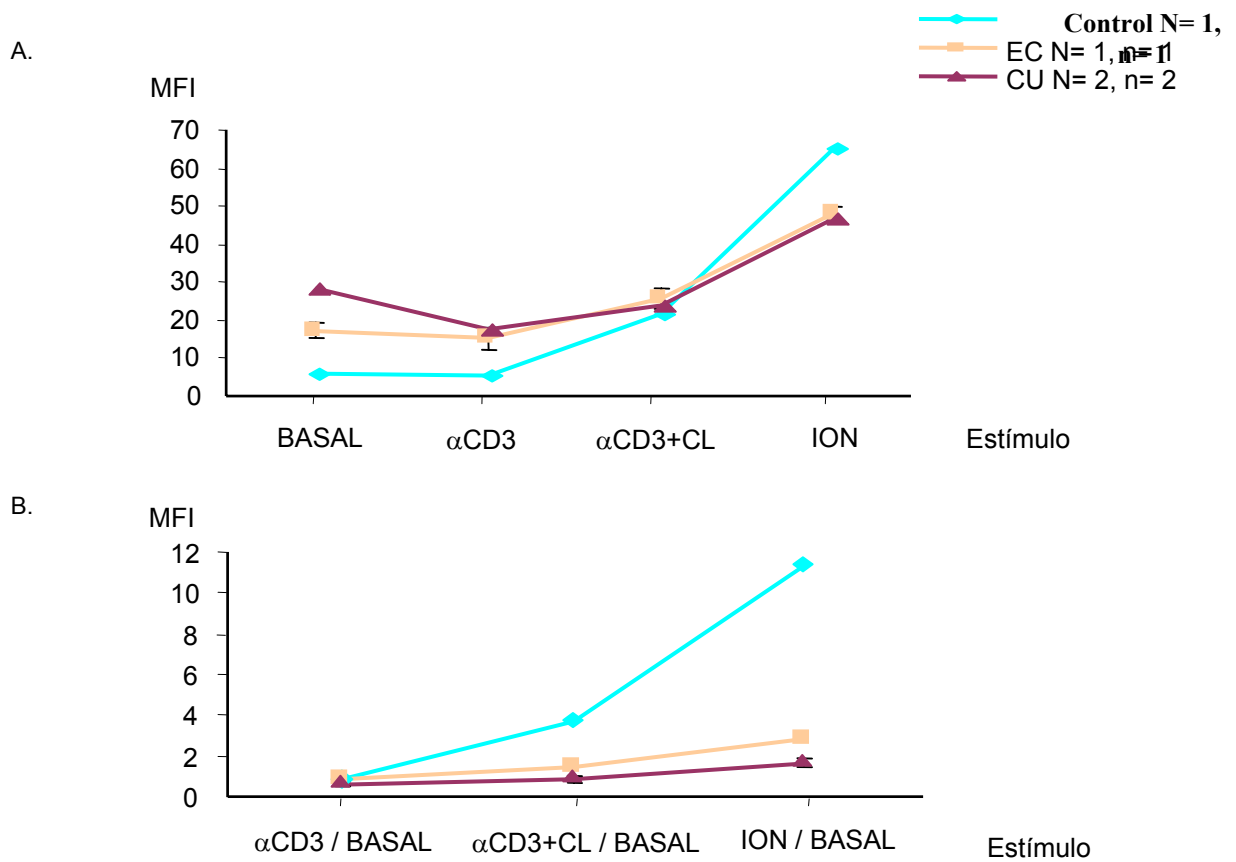
Las líneas HVS CD8<sup>+</sup> de mucosa de pacientes alcanzan un nivel de calcio en el citoplasma tras la estimulación con  $\alpha$ CD3+*crosslinker* similares a la línea control (MFI 24 $\pm$ 3 en CU, 25 en EC y 21 en control). Sin embargo, los niveles basales de calcio son superiores en las líneas de pacientes con CU (MFI 28 $\pm$ 2) y con EC (MFI 17) que en la línea control (MFI 5). Por el contrario, el nivel máximo de calcio, conseguido al estimular con Ionomicina, es menor en líneas de pacientes con CU (MFI 46 $\pm$ 2) y EC (MFI 48) que en el control (MFI 65). De esta forma el ratio entre el calcio existente en el citoplasma tras estimulación y el nivel basal es mucho menor en las líneas de pacientes que en la línea control (Figura 11).

**Figura 10.- Movilización de calcio en líneas T-HVS de mucosa CD4<sup>+</sup> procedentes de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal e individuos control.**



A. Cantidad de calcio en el citoplasma celular según la intensidad de fluorescencia media (MFI). B. Ratio entre la cantidad de calcio tras los distintos estímulos y la cantidad basal. N= número de líneas. n= número de experimentos. CL *crosslinker*.

Figura 11.- Movilización de calcio en líneas T-HVS de mucosa CD8<sup>+</sup> procedentes pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal e individuos control.



A. Cantidad de calcio en el citoplasma celular según la intensidad de fluorescencia media (MFI). B. Ratio entre la cantidad de calcio tras los distintos estímulos y la cantidad basal. N= número de líneas. n= número de experimentos. CL *crosslinker*.

### 3.- Células dendríticas

Este trabajo recoge un estudio sobre la localización de las distintas subpoblaciones de células dendríticas (DC) en diferentes lugares del tracto intestinal: placas de Peyer, mucosa de íleon y mucosa de colon, tanto en individuos control como en pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

#### 3.1.- Células dendríticas en distintas localizaciones del tracto intestinal

El análisis, mediante citometría de flujo, de las células extraídas de tejido intestinal permite identificar las células dendríticas como aquellas que expresan en superficie altos niveles de HLA-DR, pero son negativas para la expresión de los marcadores específicos de otros linajes celulares, como CD3, CD14, CD16, CD19 y CD34.

Dentro de las células que reúnen estas características (HLA-DR<sup>+</sup>, linaje<sup>-</sup>), se pueden distinguir distintas subpoblaciones de células dendríticas: las células dendríticas “mieloides”, CD11c<sup>+</sup>, y células dendríticas “plasmacitoides”, BDCA-2<sup>+</sup> y CD123<sup>+</sup>, pero CD11c<sup>-</sup>. Dentro de la población de estudio (HLA-DR<sup>+</sup> linaje<sup>-</sup>) existe otra subpoblación celular menos estudiada que consiste en las células CD11c<sup>-</sup>BDCA-2<sup>-</sup> CD123<sup>-</sup> (Figura 12).

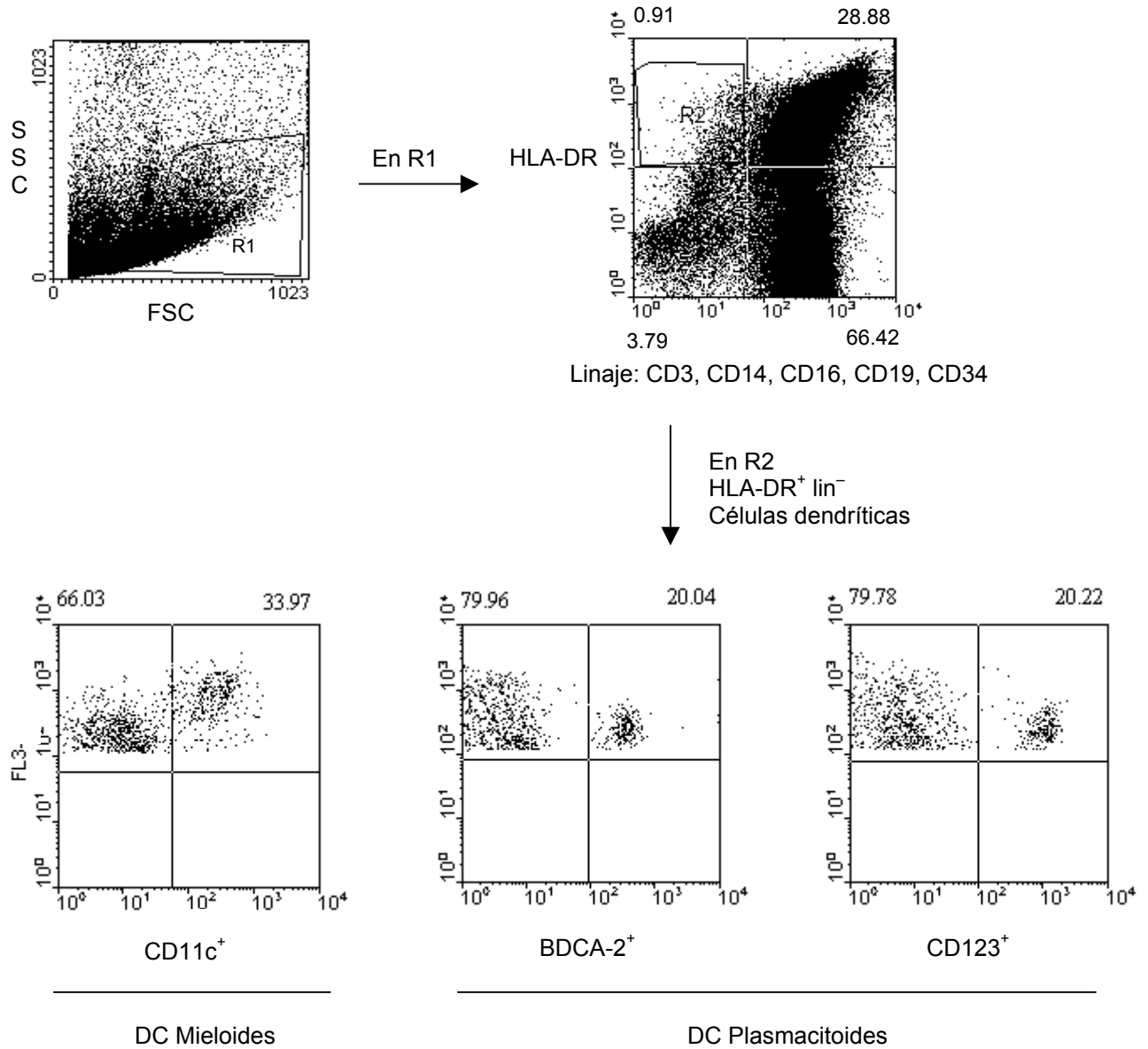
El porcentaje de células dendríticas totales en distintas localizaciones intestinales se representa en la Tabla 17. El estudio incluye placas de Peyer procedentes de controles, pacientes con EC y pacientes con CU seguidos en el Servicio de Gastroenterología Pediátrica de los hospitales Southampton General Hospital (SGH) de Southampton y Royal Free Hospital de Londres. Las muestras de mucosa de íleon proceden de pacientes de los servicios de Gastroenterología Pediátrica anteriores y del Servicio de Gastroenterología del SGH. La mucosa de colon se obtuvo de pacientes seguidos en el Servicio de Gastroenterología del SGH.

En individuos control el porcentaje de células dendríticas en placas de Peyer ( $2.4 \pm 2.2\%$ ) es mayor que en la mucosa (*lamina propria*) de íleon ( $0.7 \pm 0.5\%$ ) y colon ( $0.3 \pm 0.2\%$ ), aunque la diferencia no es estadísticamente significativa.

Dentro de cada tejido, el porcentaje de cada una de las subpoblaciones es distinta (Figura 13) (Tabla 17). En placas de Peyer hay menor porcentaje de células dendríticas mieloides que en mucosa de íleon y de colon ( $17 \pm 7\%$ ,  $65 \pm 11\%$  y  $64 \pm 10\%$  respectivamente;  $p < 0.05$  respecto a EC y  $p < 0.01$  respecto a CU), mientras que el porcentaje de células dendríticas plasmacitoides es similar en los tres tipos de tejidos estudiados. Las células dendríticas dobles negativas son más abundantes en placas de Peyer que en mucosa de íleon y de colon.

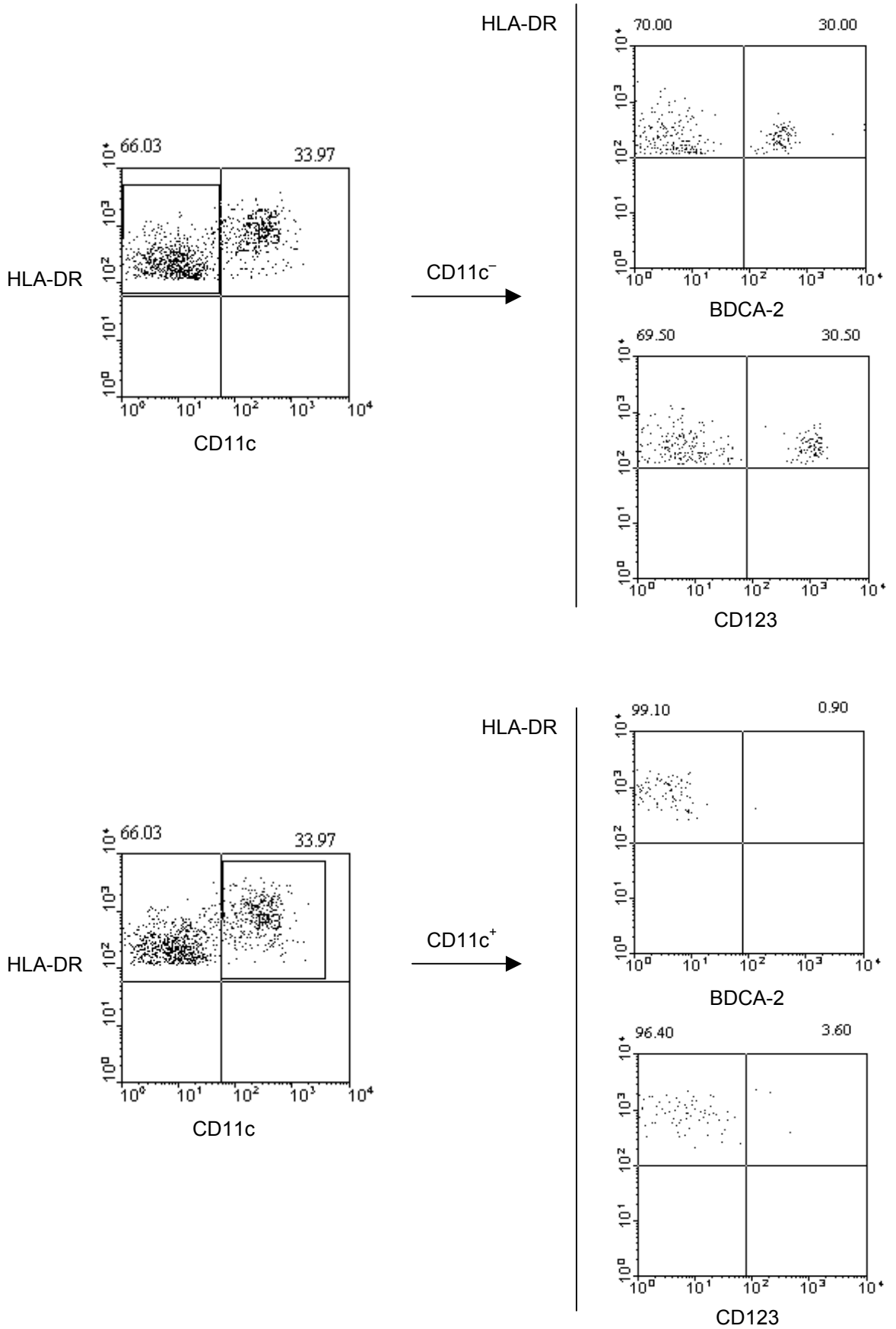
**Figura 12.- Análisis de células dendríticas en citómetro de flujo.**

A. Determinación del porcentaje de células dendríticas totales (HLA-DR<sup>+</sup> lin<sup>-</sup>) dentro de la ventana R1 escogida según las características de tamaño (FSC) y complejidad (SSC) celular. Porcentaje de células dendríticas mieloides (CD11c<sup>+</sup>) y plasmacitoides (CD123<sup>+</sup> o BDCA-2<sup>+</sup>) dentro de la ventana R2, correspondiente a células dendríticas totales.





B. Las células dendríticas CD11c<sup>+</sup> son CD123<sup>-</sup> y BDCA-2<sup>-</sup> y viceversa.



C. Las células dendríticas mieloides (azul) expresan más HLA-DR que las plasmacitoides (magenta).

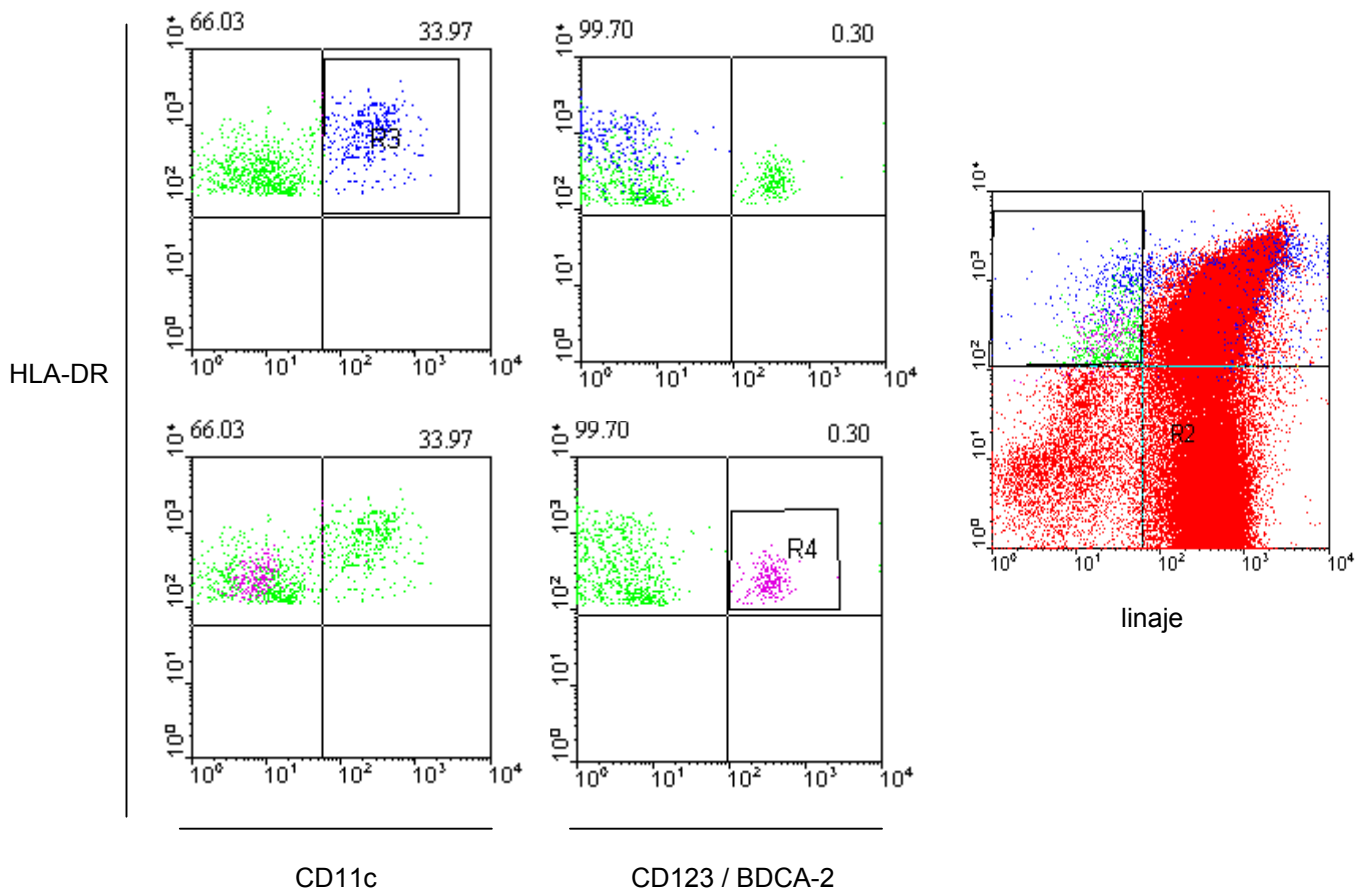


Figura 13.- Proporción de cada subpoblación de células dendríticas dentro de la población HLA-DR<sup>+</sup> linaje<sup>-</sup> en los distintos tejidos. A. Mieloides. B. Plasmacitoides. C. Dobles negativas. – media aritmética.

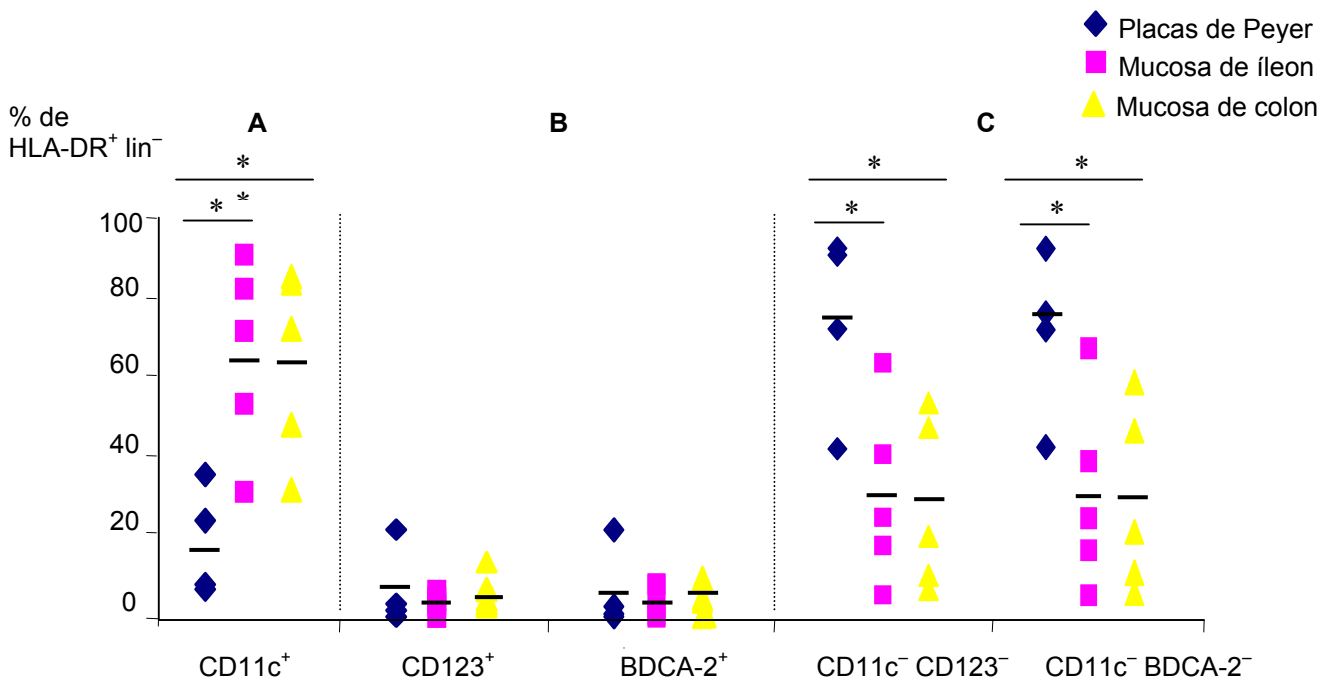


Tabla 17.- Porcentaje de las distintas subpoblaciones de células dendríticas dentro de la población HLA-DR<sup>+</sup> linaje<sup>-</sup>, y porcentaje de células dendríticas totales en distintas localizaciones.

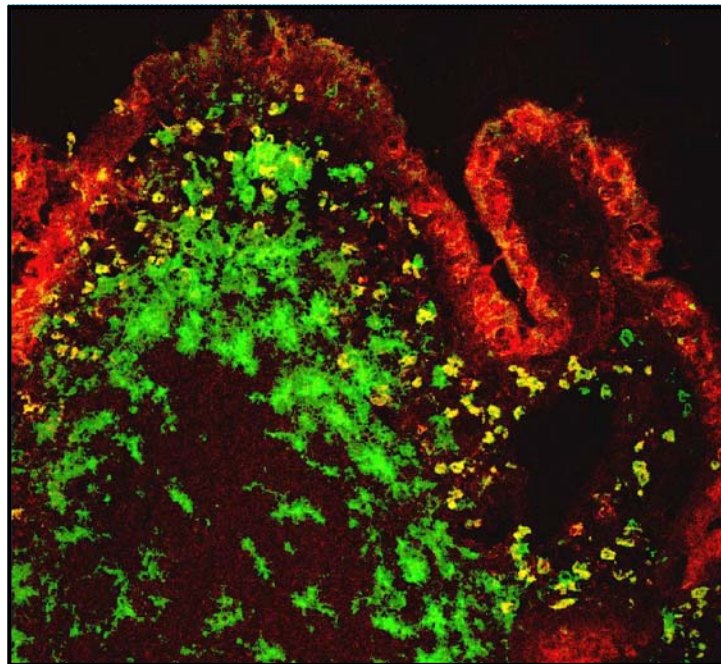
% en HLA-DR <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup>	Placas de Peyer (n)	Mucosa de íleon (n)	Mucosa de colon (n)
CD11c <sup>+</sup>	17 ± 7 (4)	65 ± 11 * (5)	64 ± 10 ** (5)
CD123 <sup>+</sup>	7 ± 5 (4)	4 ± 1 (5)	8 ± 2 (5)
BDCA-2 <sup>+</sup>	6 ± 5 (4)	4 ± 1 (5)	6 ± 1 (5)
CD11c <sup>-</sup> CD123 <sup>-</sup>	75 ± 12 (4)	31 ± 10 * (5)	29 ± 10 * (5)
CD11c <sup>-</sup> BDCA-2 <sup>-</sup>	76 ± 12 (4)	31 ± 10 * (5)	30 ± 10 * (5)
% de DC totales	2.4 ± 2.2 (4)	0.7 ± 0.5 (5)	0.3 ± 0.2 (5)

X ± SEM. (n) número de experimentos. \* p<0.05 respecto a controles. \*\* p<0.01 respecto a controles.

La distribución de las células dendríticas mieloides y plasmacitoides en las placas de Peyer del intestino humano se ha estudiado mediante técnicas de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica. La mayoría de las células dendríticas mieloides, CD11c<sup>+</sup>, se encuentran en la región subepitelial de las placas de Peyer, algunas en el centro germinal y en las zonas interfoliculares (Figura 11A, B), mientras que las células dendríticas plasmacitoides, BDCA-2<sup>+</sup>, son mucho más escasas y se encuentran en las regiones interfoliculares ricas en células T (Figura 11C, D).

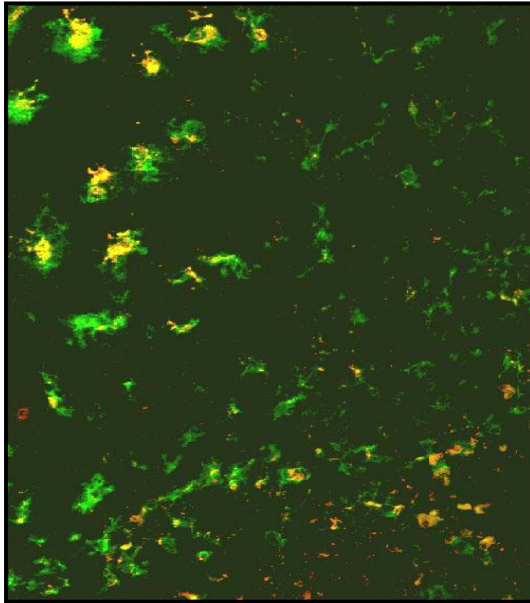
Figura 14.- Localización de las distintas subpoblaciones de células dendríticas en placas de Peyer humanas.

A.

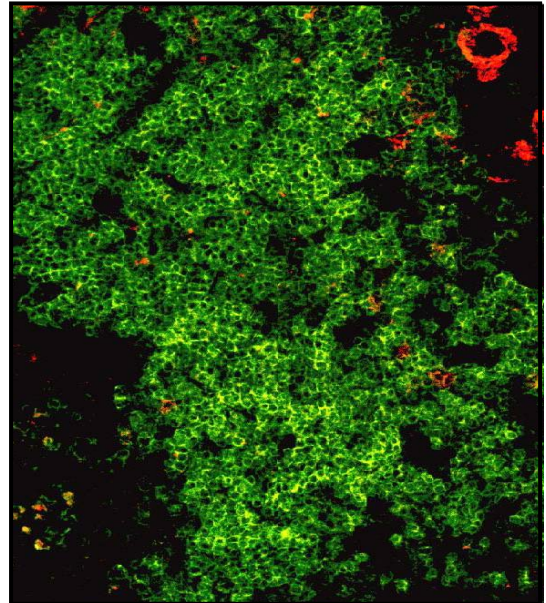


A. Inmunofluorescencia de la región del domo subepitelial de una placa de Peyer con anticuerpo  $\alpha$ CD11c verde y  $\alpha$ CD68 rojo. Las células marcadas en verde son células dendríticas mieloides, CD11c<sup>+</sup>, CD68<sup>-</sup>. Las células marcadas en amarillo son macrófagos, células positivas tanto para CD11c como para el marcador citoplásmico CD68

B.

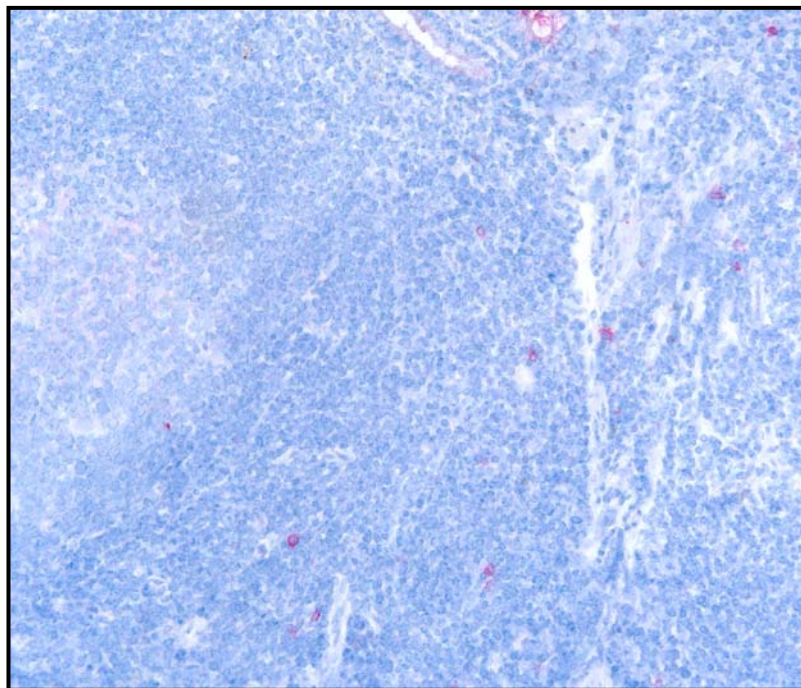


C.



B. Inmunofluorescencia de un centro germinal y parte de zona interfolicular de una placa de Peyer con los mismos anticuerpos. C. Inmunofluorescencia de la región interfolicular de una placa de Peyer. En verde se ha utilizado un anticuerpo  $\alpha$ CD3 y en rojo el anticuerpo específico de células dendríticas plasmacitoides BDCA-2.

D.



D. Corte de inmunohistoquímica de parte de un centro germinal y la zona interfolicular de una placa de Peyer. En rojo se observan las células BDCA-2<sup>+</sup>.

### 3.2.- Células dendríticas en el tracto intestinal de pacientes con EII

#### 3.2.1.- Células dendríticas en placas de Peyer de pacientes con EII

El porcentaje de células dendríticas totales en placas de Peyer parece ser menor en pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EC  $0.9 \pm 0.02\%$ , CU  $0.4\%$ ) que en controles ( $2.4 \pm 2.2\%$ ) aunque la diferencia no es estadísticamente significativa (Tabla 14).

En las placas de Peyer de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal se observa un aumento del porcentaje de células dendríticas mieloides,  $CD11c^+$ , respecto a controles ( $17\% \pm 7$ ), tanto en pacientes con EC ( $27 \pm 11\%$ ) como con CU ( $54\%$ ) (Tabla 18). El porcentaje de células dendríticas plasmacitoides en este caso aumenta en pacientes con EC ( $CD123^+ 14 \pm 8\%$ ,  $BDCA-2^+ 12 \pm 4\%$ ) y CU ( $CD123^+ 18\%$ ,  $BDCA-2^+ 19\%$ ) frente a controles ( $CD123^+ 7 \pm 5\%$ ,  $BDCA-2^+ 6 \pm 5\%$ ). Las células dendríticas dobles negativas se encuentran en un menor porcentaje en placas de Peyer de pacientes con CU ( $CD11^-CD123^- 26\%$ ,  $CD11c^-BDCA-2^- 26\%$ ) y EC ( $CD11^-CD123^- 59 \pm 20\%$ ,  $CD11c^-BDCA-2^- 61 \pm 16\%$ ) que en controles ( $CD11^-CD123^- 75 \pm 12\%$ ,  $CD11c^-BDCA-2^- 76 \pm 12\%$ ), si bien estas diferencias no son estadísticamente significativas.

**Tabla 18.- Porcentaje de las distintas subpoblaciones de células dendríticas dentro de la población HLA-DR<sup>+</sup> linaje<sup>-</sup>, y porcentaje de células dendríticas totales en placas de Peyer de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal e individuos control.**

% en HLA-DR <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup>	Control	(n)	EC	(n)	CU	(n)
<b>CD11c<sup>+</sup></b>	$17 \pm 7$	(4)	$27 \pm 11$	(2)	54	(1)
<b>CD123<sup>+</sup></b>	$7 \pm 5$	(4)	$14 \pm 8$	(2)	18	(1)
<b>BDCA-2<sup>+</sup></b>	$6 \pm 5$	(4)	$12 \pm 4$	(2)	19	(1)
<b>CD11c<sup>-</sup>CD123<sup>-</sup></b>	$75 \pm 12$	(4)	$59 \pm 20$	(2)	26	(1)
<b>CD11c<sup>-</sup>BDCA-2<sup>-</sup></b>	$76 \pm 12$	(4)	$61 \pm 16$	(2)	26	(1)
<b>% de DC totales</b>	$2.4 \pm 2.2$	(4)	$0.9 \pm 0.02$	(2)	0.4	(1)

X  $\pm$  SEM. (n) número de experimentos.

### 3.2.2.- Células dendríticas en mucosa de colon de pacientes con EI

El porcentaje de células dendríticas en células aisladas de *lamina propria* de colon es mayor en pacientes de Enfermedad de Crohn ( $4.4 \pm 5\%$ ) y Colitis Ulcerosa ( $1.1 \pm 0.7\%$ ) que en controles ( $0.3 \pm 0.2\%$ ) (Tabla 19).

Dentro de las células dendríticas (HLA-DR<sup>+</sup> linaje<sup>-</sup>), al contrario de lo que ocurre en la mucosa de colon, el porcentaje de DC mieloides, CD11c<sup>+</sup>, es mayor en controles ( $64\% \pm 10$ ) que en DC de *lamina propria* de pacientes con EC ( $34 \pm 23\%$ ) y con CU ( $24 \pm 12\%$ ;  $p < 0.05$  respecto a controles). No existen diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de DC plasmacitoides en la mucosa control (CD123<sup>+</sup>  $8 \pm 2\%$ , BDCA-2<sup>+</sup>  $6 \pm 1\%$ ) y mucosa de pacientes con EC (CD123<sup>+</sup>  $2 \pm 2\%$ , BDCA-2<sup>+</sup>  $2 \pm 2\%$ ) y CU (CD123<sup>+</sup>  $7 \pm 3\%$ , BDCA-2<sup>+</sup>  $4 \pm 4\%$ ). El porcentaje de DC dobles negativas, consecuentemente, es mayor en la mucosa de pacientes con EC (CD11c<sup>-</sup>CD123<sup>-</sup>  $64 \pm 25\%$ , CD11c<sup>-</sup>BDCA-2<sup>-</sup>  $64 \pm 25\%$ ) y CU (CD11c<sup>-</sup>CD123<sup>-</sup>  $69 \pm 12\%$ , CD11c<sup>-</sup>BDCA-2<sup>-</sup>  $72 \pm 11\%$ ) que en controles (CD11c<sup>-</sup>CD123<sup>-</sup>  $29 \pm 10\%$ , CD11c<sup>-</sup>BDCA-2<sup>-</sup>  $30 \pm 10\%$ ;  $p < 0.05$  respecto a CU) (Tabla 19), a la inversa que en placas de Peyer.

**Tabla 19.- Porcentaje de las distintas subpoblaciones de células dendríticas dentro de la población HLA-DR<sup>+</sup> linaje<sup>-</sup>, y porcentaje de células dendríticas totales en mucosa de colon de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal e individuos control.**

% en HLA-DR <sup>+</sup> Lin <sup>-</sup>	Control	(n)	EC	(n)	CU	(n)
CD11c <sup>+</sup>	64 ± 10	(5)	34 ± 23	(2)	24 ± 12 *	(4)
CD123 <sup>+</sup>	8 ± 2	(5)	2 ± 2	(2)	7 ± 3	(4)
BDCA-2 <sup>+</sup>	6 ± 1	(5)	2 ± 2	(2)	4 ± 4	(4)
CD11c <sup>-</sup> CD123 <sup>-</sup>	29 ± 10	(5)	64 ± 25	(2)	69 ± 12 *	(4)
CD11c <sup>-</sup> BDCA-2 <sup>-</sup>	30 ± 10	(5)	64 ± 25	(2)	72 ± 11 *	(4)
% de DC totales	0.3 ± 0.2	(5)	4.4 ± 5.9	(2)	1.1 ± 0.7	(4)

X ± SEM. (n) número de experimentos. \*  $p < 0.05$  respecto a controles.

# VI. Discusión

---

## 1.- Las diferencias fenotípicas encontradas en las células mononucleares en fresco entre pacientes con EII e individuos control son distintas en sangre periférica y en mucosa

Las células mononucleares procedentes de individuos sanos y de pacientes con EII muestran características distintas según provengan de sangre periférica o de *lamina propria*, dado que se trata de células de dos compartimentos distintos y la proporción de cada subtipo celular dentro del total de leucocitos, así como sus características fenotípicas, es diferente en ambos. Por ejemplo, en *lamina propria*, la mayor parte de linfocitos T son CD4<sup>+</sup> y la mayoría expresa el marcador CD45RO (MacDonald y Spencer 1994, Harvey *et al* 1989), mientras que en sangre periférica los niveles normales de linfocitos T cooperadores no suelen sobrepasar el 65%, y la mayor parte presenta el fenotipo CD45RA<sup>+</sup>. No es de extrañar, por tanto, que las diferencias encontradas en sangre periférica entre pacientes de EII e individuos control no se reflejen en células procedentes de mucosa.

Los linfocitos T de los tejidos, activados por antígeno, recirculan a través del sistema linfático y vasos sanguíneos principalmente de vuelta al órgano donde fueron activados por primera vez cuando eran células vírgenes. De manera que un comportamiento anormal de los linfocitos T de sangre periférica en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal puede estar implicada en la generación de una respuesta inmunológica alterada en la pared intestinal (Pérez-Machado *et al* 1999). Aunque los leucocitos circulantes pueden no reflejar el compartimento intestinal, sí podrían transportar mensajes o tener un papel activo también en la respuesta sistémica y extraintestinal en la EII (Bernstein *et al* 1997). Además, todavía no está claro si la inflamación intestinal en la EII implica a células T expandidas localmente, el reclutamiento de células T que migran desde la sangre a la mucosa, o ambos. (Merese *et al* 2001). Hasta ahora varios autores habían estudiado el fenotipo de los linfocitos en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal, si bien se han descrito datos distintos y contradictorios tanto en el compartimento sistémico como intestinal.

Al analizar el fenotipo de superficie de CMSP sin infectar, no se encuentran diferencias importantes en la expresión de la mayoría de los marcadores estudiados entre los pacientes con EC y CU y controles. La proporción de células de cada uno de los linajes principales de leucocitos (leucocitos totales, monocitos, células NK, linfocitos B, linfocitos T) y de linfocitos T (T cooperadores, T citotóxicos, TcR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> o TcR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>) presentes en sangre periférica de pacientes con EII y de controles, es similar. Únicamente se encuentran diferencias en la expresión de CD45RA y CD28 (Tablas 6 y 8). El porcentaje de células CD45RA<sup>+</sup> es significativamente menor en CU que en individuos control. De forma concordante, se observa un aumento en el porcentaje de células CD45RO<sup>+</sup>, no significativo probablemente debido al bajo número de pacientes analizados.

La disminución en CD45RA, y el aumento en CD45RO, en CMSP de pacientes con CU, puede reflejar un estado de activación de las células en los pacientes con EII, y concuerda con datos previamente publicados (Suzuki *et al* 2000, Meenan *et al* 1997).



Por otra parte hemos encontrado una disminución del porcentaje de células que expresan CD28 (Tabla 8), también descrito previamente en la literatura (Hildebrandt *et al* 2001). CD28 es una molécula coestimuladora requerida para la activación de las células T. La disminución encontrada puede implicar una inadecuada capacidad funcional de las células T de pacientes. En sangre periférica de pacientes con Esclerosis Múltiple, otra patología en la que se ha implicado una disfunción del Sistema Inmunológico como mecanismo etiopatogénico subyacente, se ha descrito un nivel significativamente disminuido de precursores de células T supresoras (CD28<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>), junto con un aumento significativo de células T vírgenes (CD45RA<sup>+</sup>) (Crucian *et al* 1995). Por otra parte, también durante el proceso de envejecimiento se ha descrito un descenso en la expresión de CD28 (Warrington *et al* 2003) y la expansión de células T CD45RO<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (Ginaldi *et al* 2001).

EL porcentaje de expresión de otros marcadores indicadores de activación celular, como CD25, CD26, CD80, CD86 o HLA-DR, no presenta diferencias entre pacientes y controles.

El estudio fenotípico de los linfocitos extraídos de mucosa inflamada de los pacientes con Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa, y de mucosa sana, revela algunas diferencias entre los tres grupos estudiados, y respecto a las células de sangre periférica.

En la *lamina propia*, la mayor parte de los linfocitos T pertenecen al linaje CD4. Sin embargo, el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> está disminuido en pacientes con EII, siendo significativa la diferencia entre EC y controles (Tabla 12). Consecuentemente, el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> es mayor en pacientes con CU y EC que en individuos control, a pesar de no ser una diferencia significativa. Esto indicaría que se produce un mayor reclutamiento de linfocitos T de linaje CD8 a la *lamina propia* de pacientes con EII, o bien que existe una mayor expansión de esta población en el tejido. En la literatura se encuentran datos controvertidos respecto a las diferencias entre la proporción de las distintas subpoblaciones de células T en pacientes con EII (Cagigas *et al* 1987, Ina *et al* 1999, Kugathasan *et al* 1998, Selby *et al* 1984).

El análisis de la expresión de otras moléculas de superficie aporta más información sobre el estado de activación de los linfocitos T de la mucosa de los pacientes. No se han encontrado diferencias significativas en el porcentaje de células CD45RA<sup>+</sup> ni CD45RO<sup>+</sup>, en linfocitos T totales ni en ninguna de las subpoblaciones, T cooperadores o T citotóxicos (Tabla 12). Sin embargo, en los leucocitos totales, al contrario de lo que se observa en sangre periférica, hay un mayor porcentaje de células CD45RA<sup>+</sup> en mucosa de pacientes con EC y CU que en mucosa control, siendo significativo el aumento en CU (Tabla 11B). Dado que esta diferencia en la expresión de CD45RA en la mucosa de pacientes con CU y controles no se debe a los linfocitos T, la causa del aumento en CD45RA deben ser las células B, CD19<sup>+</sup>, que también se encuentran aumentadas en mucosa de pacientes con CU. Según estos resultados, la mayor proporción de células B que infiltra la mucosa de pacientes con Colitis Ulcerosa presenta un fenotipo virgen. En sangre periférica, el porcentaje de células CD19<sup>+</sup> no es superior en pacientes con CU, por lo que las características de los linfocitos B no son responsables de alteraciones fenotípicas en las CMSP totales. Posiblemente, la menor expresión de CD45RA en CMSP de pacientes, se deba a un mayor porcentaje de linfocitos T

CD45RO<sup>+</sup>, aunque no poseemos la información necesaria para afirmarlo, dado que no conocemos la expresión conjunta de los marcadores CD45RA y CD45RO con CD3 o CD19.

Otra discrepancia de las células T de mucosa respecto a CMSP se encuentra en la expresión de la molécula coestimuladora CD28. En la mucosa, el porcentaje de células T totales CD28<sup>+</sup> es similar en pacientes con EII y en controles (Tabla 14). La distribución de este marcador varía en las poblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. La mayor parte de las células CD4<sup>+</sup> son CD28<sup>+</sup>, y apenas existen células CD28<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>. En EC, el menor porcentaje de células CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> se debe al menor porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> existente en la mucosa de pacientes. En cuanto a la población CD8<sup>+</sup>, el porcentaje de células CD28<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> se encuentra aumentado significativamente en linfocitos T de mucosa de pacientes de EC y CU frente a controles. Por el contrario, en sangre periférica, como se ha comentado anteriormente, el porcentaje de células CD28<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> es menor en pacientes con CU que en individuos sanos (Tabla 8). Es necesario tener en cuenta que en la mucosa de pacientes existe un mayor porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> que en la mucosa control, mientras que estas diferencias no se encuentran en CMSP. En pacientes con CU, este aumento corresponde a células CD28<sup>+</sup>, lo que hace que haya una expresión significativamente mayor en estos pacientes.

Meresse y cols. encuentran un aumento de células CD28<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> en mucosa inflamada de pacientes con EC respecto a la mucosa no afectada, tanto en el compartimento de linfocitos intraepiteliales como en la *lamina propria*, mientras que en el intestino sano, la mayor parte de los LIEs CD8<sup>+</sup> son CD28<sup>-</sup>, por lo que la expresión de esta molécula sería consecuencia de las condiciones de inflamación. Este trabajo recoge una comparación de las longitudes teloméricas y del repertorio de TcR V $\beta$  entre la mucosa inflamada y la no inflamada, y concluye que la mayor proporción de LIEs CD28<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> en la mucosa inflamada se debe, probablemente, más al reclutamiento de linfocitos de la periferia que a la adquisición de la molécula debido a la inflamación (Meresse *et al* 2001).

Respecto a la expresión CD25 en los linfocitos T de mucosa, en pacientes con Enfermedad de Crohn existe un porcentaje de células CD3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> mucho menor que en pacientes con CU y significativamente menor que en controles (Tabla 13). La disminución en el porcentaje de expresión de CD25 en linfocitos T de mucosa de EC, afecta tanto a las células CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> como a las CD25<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> y, por el contrario, las células CD25<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> se encuentran aumentadas significativamente respecto a controles. Así pues, el aumento en células CD8<sup>+</sup> en linfocitos T de pacientes con EC corresponde a células no activadas, en relación a la expresión de CD25.

En pacientes con Colitis Ulcerosa hay una disminución no significativa en el porcentaje de linfocitos T totales CD25<sup>+</sup>, y existe gran variabilidad en la expresión de este marcador. No se observa disminución de células CD25<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, aunque sí de células CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> o CD25<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> respecto a controles. En estos pacientes hay mayor porcentaje de células CD25<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> que en controles, por lo que el aumento en el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en Colitis Ulcerosa se debe también a células CD25<sup>-</sup>.

Las células CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, representan una población de células T supresoras que previenen la inducción de enfermedades autoinmunes organoespecíficas (Thornton y Shevach 2000). El porcentaje de estas células está reducido en mucosa de pacientes con EC y CU, lo que concuerda con que en estos pacientes exista una excesiva reactividad de las células T que lleve al desarrollo de la patología. Las células CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> ofrecen una posibilidad de aplicación clínica, en el modelo de inducción de colitis en ratón mediante la transfección de células T CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> (Mottet *et al* 2003), ya que se consigue revertir la inflamación establecida, llevando a la curación de colitis.

La molécula HLA-DR no presenta diferencias significativas de expresión entre linfocitos T de mucosa de pacientes y controles, aunque en EC el porcentaje de células T HLA-DR<sup>+</sup> es menor que en controles y pacientes con CU (Tabla 13). La menor expresión de HLA-DR se da tanto en células HLA-DR<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> como en células HLA-DR<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. En este caso, también se observa un aumento de las células HLA-DR<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> en la mucosa de pacientes respecto a controles, tanto en CU como en EC y este porcentaje es significativamente mayor en pacientes con EC que en el caso de CU.

Al igual que en CMSP, en linfocitos T de *lamina propria*, la molécula CD80 (B7.1) apenas está presente. Sin embargo en individuos con Colitis Ulcerosa, la expresión de esta molécula en mucosa es mayor que en controles y pacientes con EC (Tabla 14), lo que podría indicar que las células de estos pacientes se encuentran en mayor estado de activación. Dentro de las subpoblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> no se aprecian diferencias significativas. La expresión de CD80, en células CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>-</sup>, es similar en controles y pacientes de EC y CU, por lo que la diferencia se encontraría en las células CD80<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, que es superior en pacientes con CU. La mayor parte de las células CD8<sup>+</sup>, aumentadas en pacientes con EC y CU, corresponden a células CD80<sup>-</sup>.

El porcentaje de expresión de CD86 (B7.2) es muy variable en las muestras de mucosa control analizadas (Tabla 14). Debido a esto, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas frente a pacientes, aunque se aprecia una ligera disminución en el porcentaje de células T CD86<sup>+</sup> en pacientes con CU, disminución mucho más acusada en pacientes con EC. Dentro de las células CD8<sup>-</sup> (CD4<sup>+</sup>), la disminución en el porcentaje de células CD86<sup>+</sup> se mantiene en EC respecto a controles de forma no significativa, pero no frente a CU. En las células CD8<sup>+</sup>, la expresión de CD86 es menor en EC que en controles, y menor que en CU. El porcentaje de células CD86<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> es menor en pacientes de EC y de CU respecto a controles, mientras que el porcentaje de linfocitos T CD86<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> disminuye en EC, pero no en CU. Respecto a la expresión de CD86, el mayor porcentaje de células CD8 observado en la mucosa de pacientes con EII correspondería a células no activadas.

En conjunto, estos datos indican que el exceso de linfocitos T CD8<sup>+</sup> encontrado en la mucosa de pacientes con EC y CU, corresponde a células no activadas, que no expresan en superficie los marcadores de activación CD25 y HLA-DR o moléculas coestimuladoras CD80 y CD86. En todos los casos, el porcentaje de células T CD8<sup>+</sup> negativas para la molécula de activación en cuestión, es mayor en pacientes con EII que en controles, muchas veces de forma estadísticamente significativa. En el caso de la molécula coestimuladora CD28, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> aumentados en la mucosa de

pacientes con CU son CD28<sup>+</sup>, mientras que en EC, aumentan tanto las células CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> como las CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>.

El porcentaje de células que expresan la integrina CD103 ( $\alpha_E\beta_7$ ), característica de linfocitos intraepiteliales, en *lamina propria* de pacientes con EII es similar al de *lamina propria* control. No se encuentran diferencias significativas en el porcentaje de células CD103<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> ni CD103<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> entre pacientes de EC, CU y controles. Por lo tanto, según estos resultados, no existiría mayor porcentaje de linfocitos T en la *lamina propria* de pacientes con EII con posibilidad de alcanzar el epitelio que en la mucosa normal. Sin embargo, el número de células sí podría ser mayor, ya que en este caso se analiza la proporción dentro de los linfocitos T totales. Tampoco se han encontrado diferencias respecto a individuos sanos en el porcentaje de células que expresan esta integrina en sangre periférica de pacientes, por lo que con estos resultados no podemos concluir que en Enfermedad Inflamatoria Intestinal se produzca mayor recirculación de células de la mucosa a la sangre.

## 2.- Características fenotípicas de las líneas T-HVS procedentes de sangre periférica y de mucosa en pacientes con EII

La transformación de células T con el *Herpesvirus saimiri* ha permitido la obtención de líneas celulares estables de pacientes con EC, CU y controles, tanto de sangre periférica como de mucosa. Estas líneas permiten llevar a cabo estudios más amplios, de fenotipo de superficie y ensayos funcionales de proliferación celular y movilización de calcio, imposibles de realizar con las células obtenidas a partir de 10 ml de sangre y, principalmente, a partir de muestras de tejido de pequeño tamaño, como las biopsias. Además, las líneas obtenidas son una fuente prácticamente inagotable de células con las que realizar otros estudios funcionales, genéticos o bioquímicos, que pueden llevar a un mayor entendimiento del papel de estas células en la etiopatogenia de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal, evitando el problema de la difícil obtención de muestras tisulares en pacientes y controles, o la continua extracción de sangre a los pacientes, así como del escaso número de células obtenido de cada biopsia.

Al comparar las líneas T HVS de sangre periférica procedentes de pacientes con EII con líneas procedentes de individuos sanos no se encuentran diferencias significativas en la expresión de ninguno de los marcadores estudiados. Esto puede ser debido a que la infección por HVS homogenice el fenotipo de las líneas al activarlas, todas las líneas T-HVS obtenidas a partir de CMSP muestran un fenotipo de células CD8 activadas, o bien el virus puede haber seleccionado poblaciones similares en enfermos y controles. Sin embargo esto no parece probable al observar los resultados referentes al estudio de proliferación celular de las líneas.

Las líneas T HVS obtenidas a partir de mucosa presentan fenotipo CD4<sup>+</sup> en unos casos, y CD8<sup>+</sup> en otros, mientras que las líneas procedentes de linfocitos T de sangre periférica pertenecían al fenotipo CD8<sup>+</sup> en su totalidad. Posiblemente, el hecho de que el fenotipo predominante de los linfocitos T de *lamina propria* sea CD4<sup>+</sup>, favorece que sean estas células las infectadas por el virus, mientras que en sangre periférica el fenotipo con mayor predisposición a la transformación por HVS es el CD8, tanto en pacientes como en controles. Tanto las líneas de mucosa CD4<sup>+</sup> como las CD8<sup>+</sup>, presentan un fenotipo de células activadas, al igual que las líneas de sangre periférica, aunque la expresión de algunos marcadores las diferencia de las líneas procedentes de CMSP y entre sí.

Una de las diferencias de las líneas de mucosa, tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, con las líneas T HVS de sangre periférica, es que el porcentaje de células CD56<sup>+</sup> en las líneas de sangre periférica es más alto que en las líneas de mucosa, independientemente de que procedan pacientes con EC, con CU o de controles (Tablas 9 y 15).

La expresión de CD25 en líneas CD4<sup>+</sup> es mayor que en las líneas CD8<sup>+</sup>, tanto en controles como en líneas de pacientes con CU (Tabla 15). La línea de EC, CD8<sup>+</sup>, expresa niveles de CD25 similares al resto de líneas CD8<sup>+</sup>. En líneas de sangre periférica (Tabla 9), de fenotipo CD8<sup>+</sup>, el porcentaje de expresión de CD25 es comparable al de las líneas CD8<sup>+</sup> de mucosa. Esta diferencia entre células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> refleja el fenotipo de los linfocitos T sin infectar, ya que la mayor parte de

las células CD25<sup>+</sup> son CD4<sup>+</sup>, tanto en linfocitos de mucosa (Tabla 13) como en linfocitos de sangre periférica (Tabla 7). Por tanto, las líneas HVS, aumentan la expresión de CD25 pero mantienen las diferencias entre células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en fresco. En las líneas CD4<sup>+</sup>, el porcentaje de células CD25<sup>+</sup> es inferior en las líneas de CU que en la línea control. Esto mismo ocurría en las células CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> o CD25<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> sin infectar.

El porcentaje de células CD80<sup>+</sup>, tan escaso en linfocitos T de mucosa sin infectar, aumenta en las líneas HVS. La expresión de esta molécula coestimuladora es muy variable tanto en las líneas CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup> de pacientes y controles. No se mantiene la diferencia en el porcentaje de células CD80<sup>+</sup> que se observaba en los linfocitos CD3<sup>+</sup> de mucosa sin infectar (Tabla 14), aunque el mayor porcentaje de CD80<sup>+</sup> en CU no se observaba tampoco en cada uno de los linajes, CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> por separado. En la expresión de esta molécula se aprecia el efecto activador del virus HVS sobre el fenotipo de las células infectadas.

El trabajo de Ina y cols., con células T de mucosa de pacientes con EII cultivadas durante varias semanas en presencia de IL-2, describe una menor expresión de los marcadores CD80 y CD28 en células procedentes de pacientes con CU respecto a controles, asociado a un menor crecimiento de las líneas de pacientes (Ina *et al* 1999). En nuestro modelo, el virus reduce en todas las líneas la expresión de la molécula CD28, y aumenta la de CD80. Sin embargo, los resultados de Ina y cols. tampoco corresponden a lo encontrado en las células de *lamina propria* en fresco, donde no se observan cambios en la expresión de CD28 en linfocitos T totales, y sí un mayor porcentaje de células T CD80<sup>+</sup> en CU respecto a controles. Consecuentemente, en nuestro estudio, no se observa un menor crecimiento de las líneas procedentes de mucosa de pacientes con CU respecto a las líneas control.

La molécula CD86 diferencia también las líneas de los dos linajes diferentes. El porcentaje de células CD86<sup>+</sup> en las líneas CD4<sup>+</sup> es mayor que en líneas CD8<sup>+</sup> existiendo gran variabilidad en el porcentaje de expresión de B7.2 en estas últimas. A pesar de las diferencias entre las líneas de distinto fenotipo, en ambos tipos se observa un aumento significativo del porcentaje de células CD86<sup>+</sup> en líneas de pacientes con CU respecto a controles. Este aumento no se observaba en las células en fresco. Una explicación posible a esta discrepancia sería que en las células recién extraídas estuviese influyendo algún factor externo, que no se encuentra en los cultivos de células T infectadas, tras los meses de crecimiento transcurridos hasta la realización de los experimentos.

Debido a que la transformación con el *Herpesvirus saimiri* tiende a homogeneizar el fenotipo de las líneas obtenidas, y a que induce la expresión en superficie de moléculas propias de estados de activación, las líneas T-HVS no se pueden considerar un modelo apropiado para realizar estudios fenotípicos en linfocitos de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Sin embargo en otros estudios realizados con pacientes de cáncer gástrico las líneas han mantenido diferencias fenotípicas importantes existentes en células T no transformadas (Valeri *et al* 2003).

El estudio fenotípico de las líneas HVS aporta información sobre los efectos del virus en las células transformadas. Toda la información posible acerca del modelo de estudio es útil ya que

permite conocer sus beneficios y limitaciones, y determinar en qué casos puede ser de utilidad y en cuáles no. A pesar de las modificaciones que pueda introducir el virus HVS en las células que transforma, el hecho de que las células de pacientes se comporten de forma distinta a las células control, indica que existe alguna alteración en la célula del paciente que la diferencia de las células normales y hace que reaccione de manera distinta ante cualquier estímulo, probablemente influyendo así en el desarrollo de la patología. Las diferencias entre linfocitos T de pacientes con EII y controles se reflejan de forma más acusada en los experimentos de proliferación celular, tanto en células procedentes de sangre periférica como de mucosa.

### **3.- Las diferencias funcionales entre las líneas T-HVS de pacientes con EI e individuos sanos son distintas en sangre periférica y en mucosa**

#### ***Estudios de proliferación celular de CMSP en fresco***

Tras la estimulación con mitógenos, las células mononucleares de sangre periférica en fresco de donantes sanos y de pacientes proliferaron de manera similar, con escasas diferencias. Los pacientes con Colitis Ulcerosa rindieron siempre respuestas mayores que los controles, mientras que los pacientes de Enfermedad de Crohn alcanzaron respuestas menores, que fueron significativamente menores que en controles tras la estimulación con PHA+PMA. (Figura 3C). En este caso, las células de pacientes con CU y los controles proliferaron de manera similar y las células procedentes de pacientes con EC de forma claramente menor. Esta diferencia podría reflejar una característica distintiva de las células de EC, aunque se requiere aumentar el número de pacientes analizados para soportar esa afirmación.

El hecho de que las células de los individuos control respondan de forma similar a las células de pacientes podría ir en contra de los datos fenotípicos anteriores, que muestran un estado de activación celular en los pacientes. Sin embargo una posible explicación es que las células activadas son más difíciles de estimular que las células en reposo, o que estas células son las más propensas a entrar en apoptosis tras la estimulación, máxima en el caso de los estímulos más potentes como PMA+ION, CD28+PMA+ION, PHA+PMA, PHA+ $\alpha$ CD2,  $\alpha$ CD3+PMA,  $\alpha$ CD2+PMA. (Figura 3). Datos previamente publicados afirman que la respuesta proliferativa defectuosa encontrada en pacientes con CU no se debe a apoptosis (Pérez-Machado *et al* 1999). Alternativamente, el tratamiento médico a que están sometidos estos pacientes podría alterar la capacidad de proliferar de estas células e igualar la respuesta de las células de pacientes con la de controles (Elitsur *et al* 1990, Nielsen *et al* 2001, Stevens *et al* 1995).

#### ***Estudios de proliferación celular en líneas T-HVS de sangre periférica***

Las líneas T HVS siempre alcanzan mayores respuestas proliferativas que las CMSP en fresco (ver proliferación basal, Figura 4A). Además, y al contrario de lo encontrado en CMSP, las líneas de pacientes con EC responden más vigorosamente a los estímulos mitogénicos, tanto de membrana como citoplásmicos. Sorprendentemente, las líneas de pacientes con CU se parecen más a las líneas control que a las líneas de EC.

La estimulación mediada por CD3, bien con anticuerpo  $\alpha$ CD3 sólo o en combinación con IL-2, PHA o anticuerpos  $\alpha$ CD28, da lugar a respuestas significativamente mayores en los pacientes con EC (Figura 4C). Esta respuesta aumentada se observa también cuando las líneas se estimulan con IL-2, también un estímulo de membrana, individualmente.

La estimulación del receptor de la célula T (TcR) dispara vías de transducción de señales que regulan la activación de los linfocitos T. Este proceso depende de la actividad de proteínas tirosina



quinasa, que inducen la fosforilación de otras proteínas. Las PTKs que median en este proceso incluyen los miembros de la familia Src, lck y fyn, y los miembros de la familia Syk, ZAP70 y syk (Weiss y Littman 1994). La transformación con HVS activa la quinasa lck mediante la unión de la proteína Tip del virus (Isakov y Biesinger 2000). Este hecho, sin embargo, puede explicar que las células T transformadas, independientemente del estado clínico del donante, proliferen más que las CMSP sin infectar, pero no explica la razón de una respuesta significativamente más activa en las líneas procedentes de pacientes con EC que en líneas control y de pacientes con CU.

Los estímulos mediados por CD3 o IL-2 comparten la quinasa lck en su ruta de activación. Esta podría ser la causa de que, tras la transformación, la lck alcance un estado de activación que haga que las células respondan en mayor medida. Aun así, las líneas HVS de EC responden más que las controles o CU, lo que indica que la mayor respuesta proliferativa en estos pacientes no se debe al proceso de transformación con el virus.

Cuando se consideran los estímulos transmembrana, se encuentra también una respuesta proliferativa mayor en líneas procedentes de sangre periférica de pacientes con EC. La estimulación con PMA sola o unida a anticuerpos  $\alpha$ CD3 o  $\alpha$ CD2, da lugar a mayor respuesta proliferativa en pacientes que en individuos. La PMA es un análogo del diacilglicerol que se une y activa a la proteína quinasa C y esto resulta aumentado en células de pacientes con EC.

En las líneas HVS de sangre periférica, los datos obtenidos indican que las células de pacientes con EC son hiperreactivas, comparadas con células control y CU. Esta podría ser también la situación in vivo. De hecho, algunos datos clínicos y experimentales revelan claras diferencias entre EC y CU. La EC es una patología donde predomina una respuesta Th1, mientras que la CU está más cerca, aunque no totalmente, a una enfermedad mediada por respuestas Th2. En la primera, el uso de anticuerpos monoclonales frente a  $\text{TNF}\alpha$  (infiximab) ejerce beneficios terapéuticos, mientras que esto no ocurre en la CU. Consistente con nuestros resultados, Agnholt y Kaltoft informaron que líneas celulares obtenidas de pacientes con EC mediante estimulación continua con IL-2, producen mayores cantidades de  $\text{IFN}\gamma$  y  $\text{TNF}\alpha$  que las líneas celulares control, una producción que disminuye al añadir infiximab al cultivo (Agnholt y Kaltoft 2001). Además, la infiltración celular y los granulomas, característicos de respuestas Th1 en modelos animales de EII, se han encontrado en EC. Por el contrario, la inflamación mediada por células Th2 se caracteriza por infiltrados celulares más superficiales, semejantes a las encontradas en CU.

El hecho de que las diferencias encontradas entre las líneas T-HVS de sangre periférica no se reflejen en los ensayos de proliferación llevados a cabo con CMSP, puede deberse al efecto de algún factor presente en los pacientes (citoquinas, el tratamiento médico, alguno con efecto inmunosupresor) que pueden impedir la proliferación de las células tras la estimulación. Las líneas celulares han crecido durante varios meses y, por tanto, cualquiera de estos compuestos habría desaparecido del cultivo y las células pueden proliferar libremente. De hecho, un trabajo de Jacquot y cols. revela que líneas celulares dependientes de IL-2, obtenidas de explantes de tejido de pacientes con EC libres de tratamiento inmunosupresor, responden más vigorosamente a activación mediada

por CD3 que líneas celulares de individuos control (Jacquot et al 1996). Sin embargo, su modelo no es totalmente comparable al de este trabajo, ya que, cuando consideran líneas procedentes de sangre periférica en lugar de tejido, no encuentran diferencias en el crecimiento celular. No se puede excluir una explicación alternativa, como una tasa de apoptosis elevada en las células de los pacientes tras la estimulación. Sería necesario realizar experimentos clarificadores para averiguar si esta es la causa de la menor proliferación de las células de los pacientes de EC en fresco, aunque otros autores han demostrado que las células T de mucosa de pacientes con EC son más resistentes a apoptosis inducida por privación de IL-2, y mediada por Fas y óxido nítrico (Ina et al 1999).

Las diferencias encontradas en el comportamiento de las líneas celulares tras la activación, indica que esta distinta capacidad de proliferación es inherente a las células T, y no se debe a la influencia de otros tipos celulares, que no se encuentran en los cultivos, o a factores del medio, ya que el trabajo con líneas celulares permite controlar las condiciones externas para que sean idénticas en controles y pacientes.

#### ***Estudios de proliferación celular en líneas T-HVS de mucosa***

Las células T de lamina propia tienen una baja capacidad proliferativa en respuesta a la activación a través del TcR y necesitan coestimulación a través de CD2 (MacDonald y Spencer 1994). En las líneas T HVS de mucosa, sin embargo, la proliferación en respuesta a anticuerpos  $\alpha$ CD3 es similar a la de líneas procedentes de sangre periférica. Posiblemente el hecho de que los experimentos estén realizados con el anticuerpo pegado a plástico, de manera que se produce entrecruzamiento de los receptores, favorece la proliferación de estas células. Por otra parte, el crecimiento de estas líneas depende de la interacción CD2-CD58 (Mittrücker et al 1992), lo que hace que exista una activación continua a través de CD2. El hecho de que se trate de líneas celulares de linfocitos T que llevan en cultivo varios meses alejadas del entorno intestinal, hace que estas células no estén sometidas a posibles factores que inhiban el crecimiento mediado por CD3 producidos por otros tipos celulares como las células epiteliales (Christ et al 1997).

Los estudios de proliferación celular se han analizado por separado en líneas CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de mucosa, ya que existen diferencias entre ambas, como la expresión de CD25, que pueden determinar respuestas proliferativas distintas.

En las líneas CD4<sup>+</sup> de mucosa de pacientes con CU, la proliferación ante la mayoría de los estímulos es similar a la de controles. Existen diferencias significativas en el caso de la activación con PMA+Ionomicina, que da lugar a una mayor respuesta en las líneas procedentes de pacientes que en la línea control, lo que indica que tienen mayor capacidad proliferativa ante estímulos fuertes.

La proliferación tras estimulación a través de CD3 es muy similar en las líneas de pacientes y de control, tanto si se estimula con anticuerpo  $\alpha$ CD3 sólo o en combinación con IL-2, PMA o anticuerpos  $\alpha$ CD2 (Figura 8). La activación de las líneas de mucosa pacientes con CU a través de CD2, con anticuerpos  $\alpha$ CD2 sólo o con IL-2 o PMA, induce niveles proliferación menores que en la

línea control. Este comportamiento similar en las líneas de pacientes con Colitis Ulcerosa y en las líneas control coincide con los resultados obtenidos en líneas de sangre periférica.

Las líneas CD8<sup>+</sup> de mucosa de pacientes con CU, muestran mayor respuesta proliferativa que las líneas control en respuesta a estimulación a través de CD3, con  $\alpha$ CD3 sólo y con  $\alpha$ CD3+IL-2. La estimulación a través de CD2 no da lugar a diferencias estadísticamente significativas entre las líneas de pacientes y la línea control, aunque se observa mayor respuesta proliferativa en las líneas de pacientes, tanto tras la estimulación con anticuerpos  $\alpha$ CD2, como con  $\alpha$ CD2+IL-2 o  $\alpha$ CD2+PMA. Las líneas CD8<sup>+</sup> de mucosa pacientes con CU se comportan de manera distinta a las líneas control, presentando mayor capacidad proliferativa que estas, al contrario de lo observado en las líneas CD4<sup>+</sup> de mucosa y en las líneas de sangre periférica.

Las líneas CD8<sup>+</sup> procedentes de mucosa de pacientes con Enfermedad de Crohn, proliferan más que la línea control ante la mayoría de los estímulos (Figura 9). Esta respuesta es significativamente mayor en los casos de estimulación con Ionomicina, con anticuerpos  $\alpha$ CD3 y cuando se estimula con anticuerpos  $\alpha$ CD2+PMA. En las líneas obtenidas a partir de sangre periférica se observan los mismos resultados, las líneas de pacientes con EC proliferan más que las líneas control al estimular con la mayor parte de los mitógenos, aunque las diferencias son más acusadas y significativas en más ocasiones.

Los resultados de los estudios de proliferación indican que la activación excesiva de los linfocitos T de la mucosa intestinal, podría contribuir a la patogénesis de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal, tanto en EC como en CU. Otros autores encuentran también un mayor crecimiento de líneas de células T de mucosa de pacientes con EC respecto a células control (Kugathasan et al 1998, Ina et al 1999). Estos trabajos demuestran la mayor capacidad proliferativa en las células de estos pacientes tras la estimulación con IL-2, pero no incluyen estudios sobre el efecto de otros estímulos en estas células. El estudio de Ina y cols. no coincide con nuestros resultados en cuanto a las células de mucosa de pacientes con CU. En su trabajo, las células T de CU crecen significativamente menos que las células control. Por otra parte, Qiao y cols. describen una mayor proliferación de las células T de lamina propia de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal a la estimulación a través del TcR, (con anticuerpos  $\alpha$ CD3 en combinación con IL-2), como ocurre en las líneas T-HVS CD8<sup>+</sup>, aunque este trabajo, al igual que los anteriores, no analiza la respuesta de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> aisladamente (Qiao et al 1994). El Herpesvirus saimiri favorece la producción de citocinas Th1 en las líneas (De Carli et al 1993) y esto, posiblemente, impide que en nuestros resultados se aprecien diferencias entre pacientes y controles en respuesta a IL-2. Sin embargo, sí que se observan respuestas mayores con otros estímulos utilizados. La gran cantidad de células obtenidas mediante la transformación con HVS permite realizar análisis funcionales más amplios, con mayor número de combinaciones mitogénicas, que los incluidos en trabajos anteriores. Varios trabajos apoyan estos resultados demostrando que las células T de mucosa de pacientes con EC son más resistentes a la apoptosis inducida por la activación de la vía de CD2 (Boirivant et al 1999) y por privación de IL-2, o a la apoptosis mediada por Fas y por óxido nítrico (Ina et al 1999).

#### **4.- Los estudios de movilización de calcio en líneas T-HVS muestran variaciones entre células de sangre periférica y de mucosa, y entre pacientes con EII y controles**

##### ***Estudios de movilización de calcio en líneas T-HVS de sangre periférica.***

El estudio de un mecanismo de activación temprana, como la movilización de calcio, indica que no existe diferencia entre las líneas de sangre periférica procedentes de pacientes y las líneas control, tras la estimulación a través de CD3. Los niveles de calcio en el citoplasma alcanzados con la activación con anticuerpo  $\alpha$ CD3 o  $\alpha$ CD3+*crosslinker*, son similares en líneas de pacientes con EC, CU y controles. También lo son los niveles de calcio en reposo (basal), y, por tanto, el incremento (ratio) debido a la activación (Figura 6).

##### ***Estudios de movilización de calcio en líneas T-HVS de mucosa***

En las líneas de mucosa CD4<sup>+</sup>, los niveles de calcio intracelular de las líneas de pacientes con CU son similares a los de la línea control, tanto basalmente, como tras la estimulación a través de CD3, o los niveles máximos de calcio en el citoplasma tras estimulación con Ionomicina (Figura 10). Estos resultados coinciden con el hecho de que la activación a través de CD3 de las líneas de pacientes muestren niveles de proliferación similares a los de la línea control.

Los niveles de calcio basal en las líneas de mucosa control CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> son menores que en las líneas de sangre periférica, coincidiendo con los resultados obtenidos recientemente por Schwarz y cols. en linfocitos T en fresco (Schwarz *et al* 2004). Las líneas CD4<sup>+</sup> de mucosa de CU no se diferencian de los controles, tal como ocurre en los estudios de proliferación. Sin embargo, en las líneas CD8<sup>+</sup> de pacientes con EC y CU, los niveles de calcio son mayores en condiciones basales, igualando los niveles de las células de sangre periférica. Tras la estimulación con  $\alpha$ CD3+*crosslinker*, en cambio, las líneas de pacientes con CU responden de manera similar a las células de mucosa control, y tras la estimulación con Ionomicina el calcio intracitoplásmico total es menor que en las líneas control (Figura 11). Schwartz y cols. describen también mayores niveles de calcio en células de mucosa de pacientes con EII, aunque no en células sin estimular. Posiblemente el mayor nivel de calcio basal encontrado en las líneas CD8<sup>+</sup> de pacientes esté relacionado con la hiperreactividad de estas líneas a distintos estímulos proliferativos y con la menor capacidad de la Ionomicina de inducir mayores niveles de calcio intracelular.

Estos resultados, a pesar de ser muy preliminares, indican que existen diferencias en las líneas de sangre periférica y de mucosa en cuanto a su comportamiento en la movilización de calcio. Por otra parte, revela diferencias entre las células CD4<sup>+</sup> y las CD8<sup>+</sup> de mucosa de pacientes de Colitis Ulcerosa, indicando una mayor activación de las células CD8<sup>+</sup>, al igual que ocurre en los estudios de proliferación celular.

## 5.- Células dendríticas

### 5.1.- Células dendríticas en distintas localizaciones del tracto intestinal

Los estudios de citometría de flujo realizados en células aisladas de distintas localizaciones intestinales han permitido observar diferencias en los porcentajes de las diferentes subpoblaciones de células dendríticas en lugares con distinta función inmunológica. Esta metodología no permite conocer el número de células, sino la proporción de cada tipo celular específico dentro de una población celular de estudio. En tejido control, la proporción de células dendríticas totales (HLADR<sup>+</sup> linaje<sup>-</sup>) en placas de Peyer parece superior a la existente en la mucosa intestinal, tanto de íleon como de colon, a pesar de que las comparaciones estadísticas no revelan diferencias significativas (Tabla 17). Sin embargo, los mayores valores en el porcentaje de DC dentro de población estudiada se encontraron siempre en células obtenidas de placas de Peyer. Sería necesario aumentar el número de muestras para llegar a conclusiones definitivas, especialmente en este caso en que las células de estudio están presentes en proporciones tan escasas.

Dentro del total de células dendríticas, en individuos control, existe un mayor porcentaje de DC mieloides, CD11c<sup>+</sup>, que plasmacitoides, tanto en placas de Peyer como en mucosa de íleon y en mucosa de colon.

El porcentaje de células dendríticas mieloides en placas de Peyer es significativamente menor que en la mucosa sana de íleon y de colon. Estas células CD11c<sup>+</sup>, poseen una elevada capacidad de captura y presentación de antígenos (Robinson *et al* 1999). El hecho de que existan en la *lamina propria* de íleon y colon, en porcentajes incluso superiores a placas de Peyer, indica que estas células pueden ejercer una función importante en la presentación de antígenos a los linfocitos T de la *lamina propria*. Posiblemente estas células dendríticas empleen el mecanismo descrito en el modelo propuesto por Rescigno y cols, y emitan prolongaciones citoplásmicas a través de la barrera epitelial sin alterar su integridad, para tomar antígenos del *lumen* intestinal (Rescigno *et al* 2003).

Las células dendríticas plasmacitoides, CD123<sup>+</sup>, BDCA-2<sup>+</sup>, se encuentran en porcentajes mucho menores, en todos los tejidos estudiados y no existen diferencias significativas entre los porcentajes encontrados en placas de Peyer respecto a mucosa de íleon y de colon. (Tabla 17, Figura 13). Un estudio de Teig y cols. describe la disminución de células CD123<sup>+</sup>, pero no CD11c<sup>+</sup> de sangre periférica con la edad (Teig *et al* 2002). Las muestras de mucosa de colon pertenecen en general a individuos de mayor edad que las muestras de placas de Peyer (procedentes de pacientes del Servicio de Gastroenterología Pediátrica), sin embargo, no se observa esta disminución de CD123<sup>+</sup>. Tampoco se observa esta diferencia, ni cambios en la proporción de células CD11c<sup>+</sup> entre las muestras de mucosa de íleon procedentes de pacientes de pediatría respecto a las procedentes de adultos, por lo que podríamos suponer que las diferencias observadas no serían debidas a la edad de los pacientes, o bien la disminución en el número de DC plasmacitoides no se produce en la mucosa intestinal.

Dentro de las células dendríticas existe otra población que no expresa ninguno de los marcadores específicos de linaje mielóide o plasmacitoide. Las DC dobles negativas ( $CD11c^-CD123^-$  o  $CD11c^-BDCA-2^-$ ) están presentes en un mayor porcentaje dentro de las DC de placas de Peyer que en mucosa de íleon y colon (Tabla 17). Estas DC no se han descrito en sangre periférica en humanos (Robinson *et al* 1999), sin embargo, Hagendorens y cols. encuentran células dendríticas  $CD11c^- CD123^{dim}$  con características fenotípicas menos diferenciadas que las células dendríticas  $CD11c^+$  o  $CD123^+$ , en sangre de cordón umbilical. Esta población representa la población principal de DC en sangre de cordón umbilical y desciende con la edad (Hagendorens *et al* 2003). Estudios en animales muestran que en ratón se encuentra una población de células dendríticas que no expresa marcadores propios de DC mieloides ( $CD11b$ ) ni linfoides ( $CD8\alpha$ ) pero sí el marcador  $CD11c$ , propio de ambas subpoblaciones de células dendríticas en ratón (Iwasaki y Kelsall 2000). Las células dendríticas dobles negativas de ratón son abundantes en órganos linfoides asociados al intestino, como placas de Peyer y nódulos linfáticos mesentéricos, pero no en ganglios linfáticos periféricos o en el bazo. Se encuentran en la región subepitelial, en las zonas interfoliculares y en el epitelio folicular especializado de las placas de Peyer. Su localización junto con el hecho de que expresan altos niveles de moléculas HLA-II intracelular (característica de DC inmaduras) indica que estas células podrían ser activas en la captura de antígenos luminales, directamente, o tras el transporte por células M. No se ha demostrado *in vitro* que las células dobles negativas representen un estado de diferenciación distinto al de células  $CD11c^+$  o  $CD8^+$ , aunque no se puede excluir la posibilidad de que las DC dobles negativas requieran unas condiciones específicas para diferenciarse hacia la subpoblación mielóide o linfóide (Iwasaki y Kelsall 2001). El hecho de que en este trabajo se hayan detectado mayores niveles de DC dobles negativas en placas de Peyer que en mucosa, apoyaría la idea de que en las placas de Peyer se está produciendo una importante actividad de captura y presentación de antígeno a los linfocitos T.

Los estudios de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica demuestran que en las placas de Peyer humanas, las células dendríticas mieloides se encuentran principalmente en la región subepitelial. También se observan en la zona del centro germinal y en las zonas ricas en linfocitos T (Figura 14A y B). Otros autores habían mostrado la existencia de células  $CD11c^+$  en placas de Peyer humanas (Jameson *et al* 2002), pero, debido a que este marcador no es exclusivo de células dendríticas, es necesario contrastar la presencia de otras células  $CD11c^+$ , como los macrófagos. En este trabajo, se ha utilizado un anticuerpo  $\alpha CD68$ , de manera que únicamente las células que expresan en superficie  $CD11c$ , pero no  $CD68$ , son células dendríticas. Los macrófagos, también presentes en estas zonas, expresan ambos marcadores.

La escasa presencia de células dendríticas plasmacitoides en placas de Peyer se ha detectado únicamente en las zonas interfoliculares, ricas en células T y no en las zonas más superficiales, que podrían estar más relacionadas con la captura de antígenos del exterior. Para la detección de este subtipo de DC se ha utilizado un anticuerpo  $\alpha BDCA-2$ , (Dzionek *et al* 2000, Dzionek *et al* 2001) que asegura la especificidad, en lugar de uno frente a  $CD123$ , que se expresa también en otras células

linfoides. Sería interesante comprobar la localización *in situ* de ambos linajes de células dendríticas también en la mucosa intestinal.

Las DC que se encuentran en el domo subepitelial de las placas de Peyer poseen la situación anatómica ideal para la captura de antígenos del *lumen* intestinal transportados por las células M, y las localizadas en la región interfolicular, probablemente son las responsables de la activación de células T, ya que están en contacto con linfocitos T vírgenes (Iwasaki y Kelsall 1999).

El hecho de que no exista un marcador específico de células dendríticas que se exprese en todas las subpoblaciones, y no en otros tipos celulares, hace más difícil su localización mediante técnicas de inmunohistoquímica. En este trabajo, por tanto, no se puede demostrar la localización en el tejido de las células dendríticas dobles negativas. La citometría de flujo, en cambio, permite la identificación y caracterización de células dendríticas en poblaciones celulares aisladas a partir de muestras de tejido, aun siendo éstas escasas, como en el caso de biopsias.

## 5.2.- Células dendríticas en el tracto intestinal de pacientes con EII

### 5.2.1.- Células dendríticas en placas de Peyer de pacientes con EII

En placas de Peyer de pacientes con Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa, el porcentaje de células dendríticas es menor que en controles (Tabla 18). Esta posible disminución debería asegurarse con un mayor número de estudios, ya que el número de muestras de placas de Peyer es muy escaso. Podría deberse a un aumento en el porcentaje del resto de poblaciones celulares presentes en las muestras de pacientes, como linfocitos B y linfocitos T, en condiciones de inflamación.

En cuanto a la proporción de los distintos subtipos dentro del total de DC, se observa un aumento del porcentaje de DC mieloides en placas de Peyer de pacientes con EC y CU respecto a controles. Teniendo en cuenta la gran capacidad presentadora de antígeno de estas células, posiblemente este aumento refleje una mayor actividad de captura de antígenos y posterior presentación, en las placas de Peyer, en los pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal. También aumenta ligeramente el porcentaje de DC plasmacitoides en pacientes con EII. Las células dendríticas mieloides inducen la respuesta Th1 en linfocitos T, mientras que las DC linfoides favorecen la polarización de los linfocitos T hacia Th2 (Rissoan *et al* 1999). En placas de Peyer de pacientes afectados de EII se observa un aumento de ambas subpoblaciones, que podría reflejar un intento de mantener el equilibrio Th1-Th2 en el tejido.

La población de DC restante, dobles negativas para CD11c y CD123/BDCA-2, consecuentemente disminuye su proporción en las células dendríticas totales de placas de Peyer en pacientes con EC y CU, respecto a individuos control (Tabla 18). Según los estudios de Hagendorens y cols., las células dendríticas dobles negativas son poco diferenciadas (Hagendorens *et al* 2003). En placas de Peyer de pacientes con EII, el porcentaje de esta subpoblación se encuentra disminuido. Aunque no ha sido demostrado, no se puede excluir la posibilidad de que estas células hayan madurado hacia DC mieloides o plasmacitoides en las condiciones especiales de inflamación.

### 5.2.2.- Células dendríticas en mucosa de colon de pacientes con EII

En mucosa de colon el porcentaje de células dendríticas no varía significativamente entre pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal e individuos control. Sin embargo se observa que los porcentajes de DC son mayores en mucosa de EC y CU que en mucosa sana. En la Enfermedad Inflamatoria Intestinal se produce un aumento de la infiltración celular a la mucosa inflamada. El hecho de que el porcentaje de DC se mantenga, e incluso aumente en las células de *lamina propria* de estos pacientes, indica que también se ha producido un aumento de células dendríticas en la mucosa. Bell y cols. encuentran un menor número de células DR+lin+ (no DC) en pacientes con EII comparado con controles. Esto puede ser reflejo de un aumento *in vivo* de la diferenciación a DC durante la enfermedad, ya que existen evidencias de reclutamiento de monocitos CD14<sup>+</sup> a la mucosa de pacientes con EC y estas células pueden representar una fuente de diferenciación a DC (Bell *et al*



2001). Algunos autores han observado que el número de células dendríticas DC-SIGN<sup>+</sup> (*DC-specific ICAM-3 grabbing non-integrin*) se encuentra aumentado en la mucosa de colon de pacientes con EC (Te Velde *et al* 2003). Este marcador no se expresa en todas las células dendríticas, sino únicamente en las CD11c<sup>+</sup> y no en las CD123<sup>+</sup> y se encuentra también en algunos tipos de macrófagos tisulares (Jameson *et al* 2002). Otros trabajos encuentran células dendríticas maduras y activadas que expresan en la mucosa inflamada de pacientes con EC y CU, así como mayor capacidad estimuladora y producción de óxido nítrico en DC de sangre periférica de pacientes con CU (Ikeda *et al* 2001), aunque no especifican qué subpoblaciones de DC están implicadas en estos cambios. Bell y cols. estudian la presencia de células CD11c<sup>+</sup> y CD11c<sup>-</sup> en mucosa de colon, aunque no contemplan una mayor división ya que no incluyen marcadores específicos de DC plasmacitoides como CD123 o BDCA-2. En sus estudios no encuentran diferencias estadísticamente significativas en el número de DC en mucosa de colon inflamado aunque los valores de la mediana eran mayores. Esto se puede deber a la naturaleza imprecisa de la cuantificación de células extraídas enzimáticamente. Otra explicación posible es que los estímulos inflamatorios pueden incrementar tanto el reclutamiento como la tasa de salida de las DC de mucosa y, en consecuencia, el número de DC residentes en el tejido en un determinado momento no se encontraría necesariamente aumentado. Puede que las DC del intestino jueguen su efecto inmunorregulador en los nódulos linfáticos y sea aquí donde ejerzan su influencia sobre la EII (Bell *et al* 2001).

Al analizar los porcentajes de cada subpoblación de DC, se observa que la proporción de DC mieloides es menor en mucosa de colon de pacientes con EC y CU que en mucosa control. El porcentaje de DC plasmacitoides parece estar también ligeramente disminuido, aunque estadísticamente no existen diferencias entre los grupos de pacientes y controles (Tabla 19). Esta disminución no indica que exista menor número de estas células en mucosa de pacientes que en controles, ya que se refiere a la proporción de subpoblaciones dentro de las células dendríticas totales. Por tanto, no se puede concluir que la función de estas células, especialmente las DC mieloides, que se encuentra en menor proporción respecto a controles, tenga menor relevancia en pacientes con EII.

El hecho de que la proporción de DC mieloides y plasmacitoides sea menor, conlleva un mayor aumento en la población de DC dobles negativas. El porcentaje de células CD11c<sup>-</sup> CD123<sup>-</sup>/BDCA2<sup>-</sup> es mayor en mucosa con EC y CU que en controles, siendo la diferencia significativa entre CU y controles. Las células dendríticas inmaduras expresan receptores de citocinas inflamatorias como CCR7, lo que puede representar un modo de mantener y reclutar DC en los sitios de inflamación, donde permanecerían llevando a cabo la función de toma de antígenos. Además, las DC podrían contribuir al mantenimiento y aumento del proceso inflamatorio mediante el reclutamiento de nuevos leucocitos, ya que producen quimiocinas atrayentes de leucocitos como MIP-1 $\alpha$  y MIP-2. Finalmente, tras la pérdida de expresión o de función de algunos receptores de citocinas, las células dendríticas podrían abandonar el lugar de inflamación y alcanzar los nódulos linfáticos de drenaje a través de los vasos linfáticos aferentes (Rescigno *et al* 1999).

Los experimentos realizados muestran que existen diferencias en la presencia de las distintas subpoblaciones de células dendríticas en diferentes localizaciones intestinales, y que estas subpoblaciones varían en los pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal. En posteriores estudios, sería interesante analizar el estado de activación de las células de cada subpoblación, sus receptores de membrana y el espectro de citocinas producidas, que determinan la interacción de estas células con otras poblaciones celulares. Esto arrojaría luz sobre el papel que las DC están desempeñando en la mucosa intestinal de estos pacientes.

El conocimiento de la función de las DC, así como de su origen, y desarrollo todavía es muy escaso, especialmente *in vivo*, debido a la dificultad del aislamiento de poblaciones de células dendríticas puras en cantidad suficiente, y a que muchos de los estudios se están realizando con líneas de DC obtenidas a partir de la diferenciación de otros subtipos celulares (Sallusto y Lanzavecchia 1994, Blom *et al* 2000, Ardavín *et al* 2001). El avance de los estudios en este campo ofrecerá la posibilidad de un mayor entendimiento del papel de las DC en EII, y por tanto sobre la etiopatogenia de esta enfermedad.

## **VII. Conclusiones**

---

- 1.- En CMSP de pacientes con CU, pero no EC, se observa una disminución del porcentaje de células CD45RA<sup>+</sup> y CD28<sup>+</sup> frente a individuos control.
- 2.- En células mononucleares de *lamina propria*, sin embargo, existe un menor porcentaje de células CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> y CD86<sup>+</sup> y un mayor porcentaje de células CD45RA<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> y CD80<sup>+</sup> en pacientes con EII.
- 3.- El exceso de linfocitos T CD8<sup>+</sup> encontrado en la mucosa de pacientes con EC y CU corresponde a células no activadas, que no expresan en superficie los marcadores de activación CD25, CD80, CD86 y HLA-DR. Son CD28<sup>+</sup> en la mucosa de pacientes con CU mientras que en EC, aumentan tanto las células CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> como las CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>.
- 4.- La transformación con HVS ha permitido obtener líneas celulares T de crecimiento estable, tanto a partir de sangre periférica como de mucosa de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal e individuos control. El análisis fenotípico de las líneas no revela las diferencias antes mencionadas.
- 5.- Los estudios de proliferación celular con líneas celulares T-HVS indican un estado de hiperreactividad en respuesta a la mayoría de los estímulos en células T CD8<sup>+</sup> de sangre periférica de pacientes con EC respecto a pacientes con CU e individuos control, que no se aprecia en CMSP sin infectar.
- 5.- En líneas T HVS CD8<sup>+</sup> de mucosa, se observa mayor capacidad proliferativa en pacientes de EC y CU que en controles, en respuesta a los estímulos utilizados.
- 6.- Los estudios de movilización de calcio revelan menores niveles basales de calcio en líneas control procedentes de mucosa que de sangre periférica, así como mayores niveles basales en las líneas CD8<sup>+</sup> de mucosa de pacientes con EII respecto a mucosa control. No existen diferencias en la movilización de calcio en respuesta a  $\alpha$ CD3 entre líneas T-HVS de sangre periférica de pacientes con EII y de controles, ni entre líneas de mucosa CD4<sup>+</sup> de pacientes con CU y controles.
- 7.- Las discrepancias entre los resultados de proliferación de las células en fresco y las líneas celulares podrían deberse al tratamiento al que están sometidos los pacientes. Las diferencias entre líneas obtenidas de sangre periférica o de mucosa podrían ser debidas a la naturaleza distinta de las células de las que derivan.

- 8.- El estudio fenotípico de células dendríticas de mucosa, indica la existencia de tres linajes distintos con una localización anatómica diferente. Así, el porcentaje de DC CD11c<sup>+</sup> es mayor que el de DC CD123<sup>+</sup>BDCA-2<sup>+</sup>, tanto en placas de Peyer como en mucosa de íleon y de colon. En placas de Peyer, el porcentaje de células dendríticas CD11c<sup>+</sup> es menor que en la mucosa de íleon y de colon, mientras que las DC dobles negativas se encuentran en mayor porcentaje.
- 9.- En la mucosa de pacientes con EII se encuentran diferencias en los porcentajes de los distintos linajes de DC con respecto a la mucosa control. En placas de Peyer de pacientes con EC y CU el porcentaje de células dendríticas CD11c<sup>+</sup> y CD123<sup>+</sup>BDCA-2<sup>+</sup> es mayor que en controles, mientras que disminuye el porcentaje de DC dobles negativas, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa. En mucosa de colon el porcentaje de DC CD11c<sup>+</sup> es menor en pacientes con EC y CU que en controles, mientras que las DC dobles negativas se encuentran en mayor porcentaje en la mucosa de pacientes. En ambos casos la diferencia es estadísticamente significativa en CU.

# **VIII. Abreviaturas**

---

$\alpha$  - anti

**AP-1** - *Activator protein-1*. Proteína activadora-1

**APC** - *Allophycocyanin*. Aloficocianina

**BALT** - *Bronchus associated lymphoid tissue*. Tejido linfoide asociado al tejido bronquial

**CD** - *Cluster* de diferenciación

**CGE** - Células gliales entéricas

**CL** - *Crosslinker*. Entrecruzador

**CMF-HBSS** - *Calcium- and magnesium-free Hank's Balanced Salt Solution*. Solución salina tamponada de Hank, sin calcio ni magnesio

**CMLP** - Células mononucleares de *lamina propria*

**CMSP** - Células mononucleares de sangre periférica

**CpGODN** - *Unmethylated CpG containing oligo deoxynucleotides*. Oligonucleótidos que contienen motivos CpG imitando el DNA bacteriano

**Cpm** - Cuentas por minuto

**CTLA-4** - *Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*. Antígeno de linfocito T citotóxico

**CU** - Colitis Ulcerosa

**Cy5-PE** - Cianina 5-R-ficoeritrina

**DAG** - Diacilglicerol

**DC** - *Dendritic cells*. Células dendríticas

**DC-SIGN** - *DC specific ICAM-3 grabbing non-integrin*

**DNAds** - *Deoxyribose nucleic acid double-stranded* Ácido desoxirribonucleico de doble hebra

**Dok** - *Docking protein*. Proteína puerto

**EC** - Enfermedad de Crohn

**EDTA** - Ácido etilendiaminotetraacético

**EII** - Enfermedad Inflamatoria Intestinal

**FAE** - *Follicle associated epithelium*. Epitelio asociado al folículo

**FDC** - *Follicular dendritic cells*. Células dendríticas foliculares

**FITC** - *Fluorescein isothiocyanate*. Isotiocianato de fluoresceína

**Gads** - *GRB2-related adaptor proteins*. Proteínas adaptadoras relacionadas con GRB-2

**GALT** - *Gut associated lymphoid tissue*. Tejido linfoide asociado al intestino

**GAP** - *GTPase activating proteins*. Proteínas activadoras de GTPasas

**GEF** - *Guanine nucleotide exchange proteins*. Proteínas de intercambio de nucleótidos de guanina

**GEMs** - *Glycosphingolipid-enriched microdomains*. Microdominios enriquecidos en glicosfingolípidos

**GM-CSF** - *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

**GRB-2** - *Growth factor binding protein 2*. Proteína de unión a factor de crecimiento 2

**GTP** - *Guanosine triphosphate*. Guanosín trifosfato

- HEPES** - *N*-[2-hydroxymethyl]piperazine-*N'*-[ethanesulfonic acid]
- HVS** - *Herpesvirus saimiri*
- IFI** - Inmunofluorescencia indirecta
- IL** - Interleuquina
- IL-1ra** - *IL-1 receptor antagonist*. Antagonista del receptor de interleuquina-1
- ION** - Ionicina
- IP3** - Inositol trifosfato
- ITAM** - *Immune receptor tyrosine-based activation motifs*. Motivos de activación basados en tirosina del receptor inmunológico
- KGF** - *Keratinocyte growth factor*. Factor de crecimiento de queratinocitos.
- LAT** - *Linker for activation of T cells*. Enlace para la activación de las células T.
- LIE** - Linfocitos intraepiteliales
- LLP** - Linfocitos de *lamina propria*
- LRR** - *Leucine rich repeat*. Repeticiones ricas en leucinas.
- LT $\alpha_1\beta_2$**  - *Lymphotoxin- $\alpha_1\beta_2$* . Linfotoxina- $\alpha_1\beta_2$ .
- LTBR** - *lymphotoxin- $\beta$  receptor*. Receptor de linfotoxina- $\beta$
- MAdCAM-1** - *Mucosal addressin cell adhesion molecule 1*. Molécula de adhesión celular adresina de mucosa 1
- MALT** - *Mucosal associated lymphoid tissue*. Tejido linfoide asociado a la mucosa
- MAP** - *Mitogen-activated protein kinases*. Proteínas quinasa activadas por mitógenos
- MBL** - *Mannose binding lectin*. Lectina de unión a manosa
- M-CSF** - *Macrophage colony-stimulating factor*. Factor estimulante de colonias de macrófagos
- M-CSFR** - *Macrophage colony-stimulating factor receptor*. Receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos
- NALT** - *Nasopharynx associated lymphoid tissue*. Tejido linfoide asociado al tejido nasofaríngeo
- NF $\kappa$ B** - *Nuclear factor kappa B*. Factor nuclear kappa B
- NFAT** - *Nuclear factor of activated T-cells*. Factor nuclear de células T activadas
- PAG** - *Proteins Associated with GEMs*. Proteínas asociadas con GEMs
- p-ANCA** - *Perinuclear anti neutrophil cytoplasm antibody*. Anticuerpos anti antígenos citoplásmicos perinucleares en neutrófilos
- PBS** - *Phosphate buffered saline*. Tampón fosfato salino
- PCR** - *Polimerase chain reaction*. Reacción en cadena de la polimerasa.
- PE** - *Phycoerythrin*. Ficoeritrina
- PerCP** - *Peridin-chlorophyll protein*. Proteína clorofila peridina
- PH** - *Plextrin homology*. Homología a plextrina
- PHA** - *Phytohemagglutinin*. Fitohemaglutinina
- PI3K** - *Phosphoinositide-3 kinase*. Fosfatidil inositol 3 quinasa
- PIP2** - *Phosphoinositoldiphosphate*. Fosfatidil inositol bifosfato



- PKB** - *Protein kinase B*. Proteína quinasa B
- PKC** - *Protein kinase C*. Proteína quinasa C
- PLC- $\gamma$**  - *Phospholipase C- $\gamma$* . Fosfolipasa C- $\gamma$
- PMA** - *Phorbol myristate acetate*. Acetato de forbol mirístico
- PTK** - *Protein tyrosine kinase*. Proteína tirosina quinasa
- rhIL-2** - *recombinant human IL-2*. IL-2 humana recombinante
- R-PE** - *R-Phycoerythrin*. R-ficoeritrina
- SED** - *Subepithelial dome*. Domo subepitelial
- SH2** - *Src homology 2*. Homología a Src 2
- SLAP** - *Src-like adaptor protein*. Proteína adaptadora similar a Src
- SLP** - *SH2-domain-containing leukocyte protein*. Proteína de leucocitos que contiene dominios SH2
- SNC** - Sistema Nervioso Central
- SNE** - Sistema Nervioso Entérico
- Src** - *Steroid receptor coactivator*. Coactivador del receptor de esteroides
- StpC** - *Saimiri transformation-associated protein of subgroup C virus strains*. Proteína asociada a la transformación de *saimiri* de las cepas del subgrupo C
- TcR** - *T cell receptor*. Receptor para antígeno de la célula T
- TGF $\beta$**  - *Transforming growth factor  $\beta$* . Factor de crecimiento transformante  $\beta$
- Tip** - *Tyrosine kinase-interacting protein*. Proteína de interacción con tirosina quinasas
- TLR** - *Toll-like receptor*. Receptor similar a *Toll*
- TNF $\alpha$**  - *Tumor necrosis factor  $\alpha$* . Factor de necrosis tumoral  $\alpha$
- TNFR** - *TNF receptor*. Receptor de TNF
- TRITC** - *Tetramethyl rhodamine isothiocyanate*. Isotiocianato de tetrametil rodamina

## **IX. Bibliografía**

---

- Acuto O, Cantrell D. *T cell activation and the cytoskeleton*. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:165-84.
- Agnholt J, Kaltoft K. *Infliximab downregulates interferon-gamma production in activated gut T-lymphocytes from patients with Crohn's disease*. *Cytokine*. 2001;15(4):212-22.
- Andus T, Gross V. *Etiology and pathophysiology of inflammatory bowel disease-environmental factors*. *Hepatogastroenterology*. 2000;47(31):29-43.
- Apodaca G, Bomsel M, Arden J, Breitfeld PP, Tang K, Mostov KE. *The polymeric immunoglobulin receptor. A model protein to study transcytosis*. *J Clin Invest*. 1991;87(6):1877-82.
- Ardavin C, Martinez del Hoyo G, Martin P, Anjuere F, Arias CF, Marin AR, Ruiz S, Parrillas V, Hernandez H. *Origin and differentiation of dendritic cells*. *Trends Immunol*. 2001;22(12):691-700.
- Ardavin C. *Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells*. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(7):582-90.
- Basset C, Holton J, O'Mahony R, Roitt I. *Innate immunity and pathogen-host interaction*. *Vaccine*. 2003;21 Suppl 2:S12-23.
- Baumgart DC, Dignass AU. *Intestinal barrier function*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2002;5(6):685-94.
- Becker C, Wirtz S, Blessing M, Pirhonen J, Strand D, Bechthold O, Frick J, Galle PR, Autenrieth I, Neurath MF. *Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells*. *J Clin Invest*. 2003;112(5):693-706.
- Bell SJ, Rigby R, English N, Mann SD, Knight SC, Kamm MA, Stagg AJ. *Migration and maturation of human colonic dendritic cells*. *J Immunol*. 2001;166(8):4958-67.
- Berend KR, Jung JU, Boyle TJ, DiMaio JM, Mungal SA, Desrosiers RC, Lyerly HK. *Phenotypic and functional consequences of herpesvirus saimiri infection of human CD8+ cytotoxic T lymphocytes*. *J Virol*. 1993;67(10):6317-21.
- Bernstein CN, Sargent M, Rawsthorne P, Rector E. *Peripheral blood lymphocyte beta 2 integrin and ICAM expression in inflammatory bowel disease*. *Dig Dis Sci*. 1997;42(11):2338-49.
- Biesinger B, Muller-Fleckenstein I, Simmer B, Lang G, Wittmann S, Platzner E, Desrosiers RC, Fleckenstein B. *Stable growth transformation of human T lymphocytes by herpesvirus saimiri*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(7):3116-9.
- Biesinger B, Trimble JJ, Desrosiers RC, Fleckenstein B. *The divergence between two oncogenic Herpesvirus saimiri strains in a genomic region related to the transforming phenotype*. *Virology*. 1990;176(2):505-14.
- Bland PW, Warren LG. *Antigen presentation by epithelial cells of the rat small intestine. II. Selective induction of suppressor T cells*. *Immunology*. 1986;58(1):9-14.
- Blom B, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. *Generation of interferon alpha-producing dendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells*. *J Exp Med*. 2000;192(12):1785-96.
- Blumberg RS, Lencer WI, Zhu X, Kim HS, Claypool S, Balk SP, Saubermann LJ, Colgan SP. *Antigen presentation by intestinal epithelial cells*. *Immunol Lett*. 1999;69(1):7-11.
- Blumberg RS, Saubermann LJ, Strober W. *Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease*. *Curr Opin Immunol*. 1999;11(6):648-56.
- Boirivant M, Marini M, Di Felice G, Pronio AM, Montesani C, Tersigni R, Strober W. *Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis*. *Gastroenterology*. 1999;116(3):557-65.
- Bonen DK, Ogura Y, Nicolae DL, Inohara N, Saab L, Tanabe T, Chen FF, Foster SJ, Duerr RH, Brant SR, Cho JH, Nunez G. *Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan*. *Gastroenterology*. 2003;124(1):140-6.
- Brandtzaeg P, Baekkevold ES, Farstad IN, Jahnsen FL, Johansen FE, Nilsen EM, Yamanaka T. *Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments?* *Immunol Today*. 1999;20(3):141-51.
- Brandtzaeg P. *Nature and function of gastrointestinal antigen-presenting cells*. *Allergy*. 2001;56 Suppl 67:16-20.
- Braunstein J, Qiao L, Autschbach F, Schurmann G, Meuer S. *T cells of the human intestinal lamina propria are high producers of interleukin-10*. *Gut*. 1997;41(2):215-20.
- Bromley SK, Burack WR, Johnson KG, Somersalo K, Sims TN, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML. *The*

- immunological synapse*. Annu Rev Immunol. 2001;19:375-96.
- Bus TG, Savidge TC, Freeman TC, Cos HJ, Campbell EA, Mucke L, Jonson MH, Sofroniew MV. *Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice*. Cell. 1998;93:189-201.
- Cabanillas JA, Cambroner R, Pacheco-Castro A, Garcia-Rodriguez MC, Martin-Fernandez JM, Fontan G, Regueiro JR. *Characterization of Herpesvirus saimiri-transformed T lymphocytes from common variable immunodeficiency patients*. Clin Exp Immunol. 2002;127(2):366-73.
- Cabarrocas J, Savidge TC, Liblau RS. *Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease*. Glia. 2003;41:81-93.
- Cagigas J, Echevarria S, Casafont F, Lozano JL, Rodriguez de Lope C, Pons Romero F. *Intestinal and peripheral blood lymphocyte subpopulations in Crohn's disease*. Allergol Immunopathol. 1987;15(3):133-6.
- Calkins BM. *A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease*. Dig Dis Sci. 1989;34(12):1841-54.
- Carmo AM, Castro MA, Arosa FA. *CD2 and CD3 associate independently with CD5 and differentially regulate signaling through CD5 in Jurkat T cells*. J Immunol. 1999;163(8):4238-45.
- Cebra JJ, Shroff KE. *Peyer's patches as Inductive sites for IgA commitment*. En: Handbook of Mucosal Immunology. Edited by: Ogra PL, Lamm ME, McGheeJR, Mestecky J, Strober W, Bienenstock J. 1994. Ed. Academic Press.151-158.
- Christ AD, Colgan SP, Balk SP, Blumberg RS. *Human intestinal epithelial cell lines produce factor(s) that inhibit CD3-mediated T-lymphocyte proliferation*. Immunol Lett. 1997;58(3):159-65.
- Cornet A, Savidge TC, Cabarrocas J, Deng WL, Colombel JF, Lassman H, Desreumaux P, Liblau RS. *Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease?*. PNAS. 2001;98:13306-13311.
- Croitoru K, Bienenstock J. *Characteristics and functions of mucosa-associated lymphoid tissue*. En: Handbook of Mucosal Immunology. Edited by: Ogra PL, Lamm ME, McGheeJR, Mestecky J, Strober W, Bienenstock J. 1994. Ed. Academic Press. 141-149.
- Crucian B, Dunne P, Friedman H, Ragsdale R, Pross S, Widen R. *Alterations in levels of CD28-/CD8+ suppressor cell precursor and CD45RO+/CD4+ memory T lymphocytes in the peripheral blood of multiple sclerosis patients*. Clin Diagn Lab Immunol. 1995;2(2):249-52.
- Davis MM, Krogsgaard M, Huppa JB, Sumen C, Purbhoo MA, Irvine DJ, Wu LC, Ehrlich L. *Dynamics of cell surface molecules during T cell recognition*. Annu Rev Biochem. 2003;72:717-42.
- De Carli M, Berthold S, Fickenscher H, Fleckenstein IM, D'Elios MM, Gao Q, Biagiotti R, Giudizi MG, Kalden JR, Fleckenstein B. *Immortalization with Herpesvirus saimiri modulates the cytokine secretion profile of established Th1 and Th2 human T cell clones*. J Immunol. 1993 Nov 1;151(9):5022-30.
- De la Rosa G, Longo N, Rodriguez-Fernandez JL, Puig-Kroger A, Pineda A, Corbi AL, Sanchez-Mateos P. *Migration of human blood dendritic cells across endothelial cell monolayers: adhesion molecules and chemokines involved in subset-specific transmigration*. J Leukoc Biol. 2003;73(5):639-49.
- Dwinell MB, Johanesen PA, Smith JM. *Immunobiology of epithelial chemokines in the intestinal mucosa*. Surgery. 2003;133(6):601-7.
- Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, Buck DW, Schmitz J. *BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood*. J Immunol. 2000;165(11):6037-46.
- Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, Gunther G, Johnston I, Lanzavecchia A, Nagasaka T, Okada T, Vermi W, Winkels G, Yamamoto T, Zysk M, Yamaguchi Y, Schmitz J. *BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction*. J Exp Med. 2001;194(12):1823-34.
- Eiras P, Leon F, Camarero C, Lombardia M, Roldan E, Bootello A, Roy G. *Intestinal intraepithelial lymphocytes contain a CD3- CD7+ subset expressing natural killer markers and a singular pattern of adhesion molecules*. Scand J Immunol. 2000;52(1):1-6.
- Elitsur Y, Freedland CP, Luk GD. *Inhibition of DNA synthesis in human peripheral and lamina propria lymphocytes by 5-aminosalicylic acid and hydrocortisone*. Reg Immunol. 1990;3(1):56-61.
- Farstad IN, Halstensen TS, Lien B, Kilshaw PJ, Lazarovits AI, Brandtzaeg P, Lazarovitz AI. *Distribution of beta 7 integrins in human intestinal*

- mucosa and organized gut-associated lymphoid tissue.* Immunology. 1996;89(2):227-37.
- Fickenscher H, Bokel C, Knappe A, Biesinger B, Meinel E, Fleischer B, Fleckenstein B, Broker BM. *Functional phenotype of transformed human alphabeta and gammadelta T cells determined by different subgroup C strains of herpesvirus saimiri.* J Virol. 1997;71(3):2252-63.
- Fiocchi C. *Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis.* Gastroenterology. 1998;115(1):182-205.
- Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W. *Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5.* J Immunol. 1996;157(3):1261-70.
- Gewirtz AT, Madara JL. *Periscope, up! Monitoring microbes in the intestine.* Nat Immunol. 2001;2(4):288-90.
- Gilat T, Hacoheh D, Lilos P, Langman MJ. *Childhood factors in ulcerative colitis and Crohn's disease. An international cooperative study.* Scand J Gastroenterol. 1987;22(8):1009-24.
- Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto F, Modesti M, Quagliano D. *Changes in the expression of surface receptors on lymphocyte subsets in the elderly: quantitative flow cytometric analysis.* Am J Hematol. 2001;67(2):63-72.
- Gonsky R, Deem RL, Hughes CC, Targan SR. *Activation of the CD2 pathway in lamina propria T cells up-regulates functionally active AP-1 binding to the IL-2 promoter, resulting in messenger RNA transcription and IL-2 secretion.* J Immunol. 1998;160(10):4914-22.
- Gotteland M, Lopez M, Muñoz C, Saez R, Altshiller H, Llorens P, Brunser O. *Local and systemic liberation of proinflammatory cytokines in ulcerative colitis.* Dig Dis Sci. 1999;44(4):830-5.
- Grabbe S, Kampgen E, Schuler G. *Dendritic cells: multi-lineal and multi-functional.* Immunol Today. 2000;21(9):431-3.
- Groux H, Powrie F. *Regulatory T cells and inflammatory bowel disease.* Immunol Today. 1999;20(10):442-5.
- Hagendorens MM, Ebo DG, Schuerwegh AJ, Huybrechts A, Van Bever HP, Bridts CH, De Clerck LS, Stevens WJ. *Differences in circulating dendritic cell subtypes in cord blood and peripheral blood of healthy and allergic children.* Clin Exp Allergy. 2003;33(5):633-9.
- Harrison WJ. *Autoantibodies against intestinal and gastric mucous cells in ulcerative colitis.* Lancet 1965;i:1346-50.
- Harvey J, Jones DB, Wright DH. *Leucocyte common antigen expression on T cells in normal and inflamed human gut.* Immunology. 1989;68(1):13-7.
- Hayday A, Theodoridis E, Ramsburg E, Shires J. *Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology.* Nat Immunol. 2001;2(11):997-1003.
- Hershberg RM, Framson PE, Cho DH, Lee LY, Kovats S, Beitz J, Blum JS, Nepom GT. *Intestinal epithelial cells use two distinct pathways for HLA class II antigen processing.* J Clin Invest. 1997;100(1):204-15.
- Hibi T, Kobayashi K, Brown WR. *Enzyme linked immunosorbent assay and immunoprecipitation studies on anti-goblet cell antibody using a mucin producing cell line in patients with inflammatory bowel disease.* Gut 1994; 35:224-30.
- Hildebrandt M, Rose M, Ruter J, Salama A, Monnikes H, Klapp BF. *Dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) in patients with inflammatory bowel disease.* Scand J Gastroenterol 2001;36(10):1067-72.
- Howie D, Spencer J, DeLord D, Pitzalis C, Wathen NC, Dogan A, Akbar A, MacDonald TT. *Extrathymic T cell differentiation in the human intestine early in life.* J Immunol. 1998;161(11):5862-72.
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. *Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease.* Nature. 2001;411(6837):599-603.
- Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G. *Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16.* Nature. 1996;379(6568):821-3.

- Hutchcroft JE, Franklin DP, Tsai B, Harrison-Findik D, Varticovski L, Bierer BE. *Phorbol ester treatment inhibits phosphatidylinositol 3-kinase activation by, and association with, CD28, a T-lymphocyte surface receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(19):8808-12.
- Ina K, Itoh J, Fukushima K, Kusugami K, Yamaguchi T, Kyokane K, Imada A, Binion DG, Musso A, West GA, Dobre GM, McCormick TS, Lapetina EG, Levine AD, Ottaway CA, Fiocchi C. *Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance*. J Immunol. 1999;163(2):1081-90.
- Inatsuki A, Yasukawa M, Kobayashi Y. *The effect of human T cell leukaemia virus type I infection on a herpes simplex virus-specific CD8+ cytotoxic T cell clone*. Br J Haematol. 1991;77(3):311-4.
- Inohara N, Ogura Y, Nunez G. *Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens*. Curr Opin Microbiol. 2002;5(1):76-80.
- Isakov N, Biesinger B. *Lck protein tyrosine kinase is a key regulator of T-cell activation and a target for signal intervention by Herpesvirus saimiri and other viral gene products*. Eur J Biochem. 2000;267(12):3413-21.
- Ishiguro Y. *Mucosal proinflammatory cytokine production correlates with endoscopic activity of ulcerative colitis*. J Gastroenterol. 1999;34(1):66-74.
- Ito T, Amakawa R, Kaisho T, Hemmi H, Tajima K, Uehira K, Ozaki Y, Tomizawa H, Akira S, Fukuhara S. *Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets*. J Exp Med. 2002;195(11):1507-12.
- Iwasaki A, Kelsall BL. *Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells*. J Exp Med. 1999;190(2):229-39.
- Iwasaki A, Kelsall BL. *Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine*. J Exp Med. 2000;191(8):1381-94.
- Iwasaki A, Kelsall BL. *Mucosal immunity and inflammation. I. Mucosal dendritic cells: their specialized role in initiating T cell responses*. Am J Physiol. 1999;276(5 Pt 1):G1074-8.
- Jacquot S, Modigliani R, Kuzniak I, Boursell L, Bensussan A. *Enhanced CD3 monoclonal antibody induced proliferation of colonic mucosal T lymphocytes in Crohn's disease patients free of corticosteroid or immunosuppressor treatment*. Clin Immunol Immunopathol. 1996;79(1):20-4.
- Jameson B, Baribaud F, Pohlmann S, Ghavimi D, Mortari F, Doms RW, Iwasaki A. *Expression of DC-SIGN by dendritic cells of intestinal and genital mucosae in humans and rhesus macaques*. J Virol. 2002;76(4):1866-75.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD editores. *Immunobiología. El Sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad*. 2000. Ed. Masson. Barcelona. 4ª Edición.
- Jayanthi V, Probert CS, Sher KS, Mayberry JF. *Current concepts of the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease*. Am J Gastroenterol. 1991;86(11):1566-72.
- Kaiserlian D, Vidal K, Revillard JP. *Murine enterocytes can present soluble antigen to specific class II-restricted CD4+ T cells*. Eur J Immunol. 1989;19(8):1513-6.
- Kappeler A, Mueller C. *The role of activated cytotoxic T cells in inflammatory bowel disease*. Histol Histopathol. 2000;15(1):167-72.
- Karlinger K, Gyorke T, Mako E, Mester A, Tarjan Z. *The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Eur J Radiol. 2000;35(3):154-67.
- Kelsall BL, Strober W. *Host defenses at mucosal surfaces*. En: Rich RR, editor in chief. Clinical immunology. Principles and practice. Ed. Mosby. 1996. Vol. I, p. 299-329.
- Kraft MS, Henning G, Fickenscher H, Lengenfelder D, Tschopp J, Fleckenstein B, Meinel E. *Herpesvirus saimiri transforms human T-cell clones to stable growth without inducing resistance to apoptosis*. J Virol. 1998;72(4):3138-45.
- Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. *Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12*. Eur J Immunol. 2001;31(10):3026-37.
- Kugathasan S, Willis J, Dahms BB, O'Riordan MA, Hupertz V, Binion DG, Boyle JT, Fiocchi C. *Intrinsic hyperreactivity of mucosal T cells to interleukin-2 in pediatric Crohn's disease*. J Pediatr. 1998;133(5):675-81.

- Laroux FS, Pavlick KP, Wolf RE, Grisham MB. *Dysregulation of intestinal mucosal immunity: implications in inflammatory bowel disease*. News Physiol Sci. 2001;16:272-7.
- Lee H, Choi JK, Li M, Kaye K, Kieff E, Jung JU. *Role of cellular tumor necrosis factor receptor-associated factors in NF-kappaB activation and lymphocyte transformation by Herpesvirus saimiri STP*. J Virol. 1999;73(5):3913-9.
- Leithauser F, Trobonjaca Z, Möller P, Reinmann J. *Clustering of colonic lamina propria CD4+ T cells to subepithelial dendritic cell aggregates precedes the development of colitis in a murine adoptive transfer model*. Lab Invest. 2001;81:1339-49.
- Leo A, Schraven B. *Adapters in lymphocyte signalling*. Curr Opin Immunol. 2001;13(3):307-16.
- Leon F, Roldan E, Sanchez L, Camarero C, Bootello A, Roy G. *Human small-intestinal epithelium contains functional natural killer lymphocytes*. Gastroenterology. 2003;125(2):345-56.
- Lewis CM, Broussard C, Czar MJ, Schwartzberg PL. *Tec kinases: modulators of lymphocyte signaling and development*. Curr Opin Immunol. 2001;13(3):317-25.
- Liu Z, Geboes K, Colpaert S, D'Haens GR, Rutgeerts P, Ceuppens JL. *IL-15 is highly expressed in inflammatory bowel disease and regulates local T cell-dependent cytokine production*. J Immunol. 2000;164(7):3608-15.
- London SD, Cebra-Thomas JA, Rubin DH, Cebra JJ. *CD8 lymphocyte subpopulations in Peyer's patches induced by reovirus serotype 1 infection*. J Immunol. 1990;144(8):3187-94.
- MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DN. *Characterization of human blood dendritic cell subsets*. Blood. 2002;100(13):4512-20.
- MacDonald TT, Monteleone G, Pender SL. *Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease*. Scand J Immunol. 2000;51(1):2-9.
- MacDonald TT, Monteleone G. *IL-12 and Th1 immune responses in human Peyer's patches*. Trends Immunol. 2001;22(5):244-7.
- MacDonald TT, Spencer J. *Gut associated lymphoid tissue*. En: Handbook of Mucosal Immunology. Edited by: Ogra PL, Lamm ME, McGheeJR, Mestecky J, Strober W, Bienenstock J. 1994. Ed. Academic Press. 415-424.
- MacDonald TT. *The mucosal immune system*. Parasite Immunol. 2003;25(5):235-46.
- Macpherson AJ, Hunziker L, McCoy K, Lamarre A. *IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms*. Microbes Infect. 2001;3(12):1021-35.
- Maldonado-Lopez R, De Smedt T, Michel P, Godfroid J, Pajak B, Heirman C, Thielemans K, Leo O, Urbain J, Moser M. *CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo*. J Exp Med. 1999;189(3):587-92.
- Martini GA, Brandes JW. *Increased consumption of refined carbohydrates in patients with Crohn's disease*. Klin Wochenschr. 1976;54(8):367-71.
- Martin-Villa JM, Ferre-Lopez S, Lopez-Suarez JC, Perez-Blas M, Castellano-Tortajada G, Sanchez-Gomez F, Arnaiz-Villena A. *Successful in vitro immortalization of human intestinal mucosal lymphocytes with Herpesvirus saimiri*. Tissue Antigens. 1998;52(5):430-4.
- Martín-Villa JM, Rodríguez Juan C. *Sistema inmunológico gastrointestinal*. En: C. Pérezagua, editor. Tratado de Medicina Interna. Clamagirand; 2003.
- Mayberry JF, Rhodes J, Newcombe RG. *Increased sugar consumption in Crohn's disease*. Digestion. 1980;20(5):323-6.
- Mayer L, Shlien R. *Evidence for function of Ia molecules on gut epithelial cells in man*. J Exp Med. 1987;166(5):1471-83.
- McGhee JR, Mestecky J, Dertzbaugh MT, Eldridge JH, Hirasawa M, Kiyono H. *The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development*. Vaccine. 1992;10(2):75-88.
- Meenan J, Spaans J, Grool TA, Pals ST, Tytgat GN, van Deventer SJ. *Altered expression of alpha 4 beta 7, a gut homing integrin, by circulating and mucosal T cells in colonic mucosal inflammation*. Gut. 1997;40(2):241-6.
- Meinl E, Hohlfeld R, Wekerle H, Fleckenstein B. *Immortalization of human T cells by Herpesvirus saimiri*. Immunol Today. 1995;16(2):55-8.
- Meinl E, Lengenfelder D, Blank N, Pirzer R, Barata L, Hivroz C. *Differential requirement of ZAP-70 for CD2-mediated activation pathways of mature human T cells*. J Immunol. 2000;165(7):3578-83.
- Meresse B, Dubucquoi S, Tourvieille B, Desreumaux P, Colombel JF, Dessaint JP. *CD28+ intraepithelial lymphocytes with long*

- telomeres are recruited within the inflamed ileal mucosa in Crohn disease. *Hum Immunol*. 2001;62(7):694-700.
- Meucci G, Bortoli A, Riccioli FA, Girelli CM, Radaelli F, Rivolta R, Tatarella M. *Frequency and clinical evolution of indeterminate colitis: a retrospective multi-centre study in northern Italy. GSMII (Gruppo di Studio per le Malattie Infiammatorie Intestinali)*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1999;11(8):909-13.
- Mittrucker HW, Muller-Fleckenstein I, Fleckenstein B, Fleischer B. *CD2-mediated autocrine growth of herpes virus saimiri-transformed human T lymphocytes*. *J Exp Med*. 1992;176(3):909-13.
- Mottet C, Uhlig HH, Powrie F. *Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells*. *J Immunol*. 2003;170(8):3939-43.
- Mowat AM. *Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens*. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(4):331-41.
- Nagata S, McKenzie C, Pender SL, Bajaj-Elliott M, Fairclough PD, Walker-Smith JA, Monteleone G, MacDonald TT. *Human Peyer's patch T cells are sensitized to dietary antigen and display a Th cell type 1 cytokine profile*. *J Immunol*. 2000;165(9):5315-21.
- Nagler-Anderson C, Terhoust C, Bhan AK, Podolsky DK. *Mucosal antigen presentation and the control of tolerance and immunity*. *Trends Immunol*. 2001;22(3):120-2.
- Neurath MF, Finotto S, Fuss I, Boirivant M, Galle PR, Strober W. *Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease: to die or not to die, that is the mucosal question*. *Trends Immunol*. 2001;22(1):21-6.
- Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. *The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity*. *Nat Med*. 2002;8(6):567-73.
- Neurath MF, Fuss I, Schurmann G, Pettersson S, Arnold K, Muller-Lobeck H, Strober W, Herfarth C, Buschenfelde KH. *Cytokine gene transcription by NF-kappa B family members in patients with inflammatory bowel disease*. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;859:149-59.
- Neutra MR, Pringault E, Kraehenbuhl JP. *Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses*. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:275-300.
- Nielsen OH, Vainer B, Rask-Madsen J. *Review article: the treatment of inflammatory bowel disease with 6-mercaptopurine or azathioprine*. *Aliment Pharmacol Ther*. 2001;15(11):1699-708.
- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. *A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease*. *Nature*. 2001;411(6837):603-6.
- Ohmen JD, Yang HY, Yamamoto KK, Zhao HY, Ma Y, Bentley LG, Huang Z, Gerwehr S, Pressman S, McElree C, Targan S, Rotter JI, Fischel-Ghodsian N. *Susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16 has a role in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis*. *Hum Mol Genet*. 1996;5(10):1679-83.
- Okazawa A, Kanai T, Watanabe M, Yamazaki M, Inoue N, Ikeda M, Kurimoto M, Ishii H, Hibi T. *Th1-mediated intestinal inflammation in Crohn's disease may be induced by activation of lamina propria lymphocytes through synergistic stimulation of interleukin-12 and interleukin-18 without T cell receptor engagement*. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(12):3108-17.
- Oliva-Hemker M, Fiocchi C. *Etiopathogenesis of inflammatory bowel disease: the importance of the pediatric perspective*. *Inflamm Bowel Dis*. 2002;8(2):112-28.
- Olweus J, BitMansour A, Warnke R, Thompson PA, Carballido J, Picker LJ, Lund-Johansen F. *Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(23):12551-6.
- Orholm M, Fonager K, Sorensen HT. *Risk of ulcerative colitis and Crohn's disease among offspring of patients with chronic inflammatory bowel disease*. *Am J Gastroenterol*. 1999;94(11):3236-8.
- Pacheco-Castro A, Marquez C, Toribio ML, Ramiro AR, Trigueros C, Regueiro JR. *Herpesvirus saimiri immortalization of alpha beta and gamma delta human T-lineage cells derived from CD34+ intrathymic precursors in vitro*. *Int Immunol*. 1996;8(11):1797-805.
- Pender SL, Quinn JJ, Sanderson IR, MacDonald TT. *Butyrate upregulates stromelysin-1 production by intestinal mesenchymal cells*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000;279(5):G918-24.
- Podolsky DK. *The current future understanding of inflammatory bowel disease*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2002;16(6):933-43.



- Poli G, Bordignon C. *Unplugging the T cell receptor*. Nat Immunol. 2003;4(10):943-4.
- Pulendran B, Banchereau J, Maraskovsky E, Maliszewski C. *Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors*. Trends Immunol. 2001;22(1):41-7.
- Qiao L, Golling M, Autschbach F, Schurmann G, Meuer SC. *T cell receptor repertoire and mitotic responses of lamina propria T lymphocytes in inflammatory bowel disease*. Clin Exp Immunol. 1994;97(2):303-8.
- Rescigno M, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P. *Dendritic cells at the end of the millennium*. Immunol Cell Biol. 1999;77(5):404-10.
- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P. *Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria*. Nat Immunol. 2001; 2(4):361-7.
- Rescigno M. *Identification of a new mechanism for bacterial uptake at mucosal surfaces, which is mediated by dendritic cells*. Pathol Biol. 2003; 51(2):69-70.
- Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu YJ. *Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation*. Science. 1999;283(5405):1183-6.
- Rivero-Carmona M, Porras O, Pelaez B, Pacheco-Castro A, Gatti RA, Regueiro JR. *Membrane and transmembrane signaling in Herpesvirus saimiri-transformed human CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes is ATM-independent*. Int Immunol. 2000;12(6):927-35.
- Robinson SP, Patterson S, English N, Davies D, Knight SC, Reid CD. *Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells*. Eur J Immunol. 1999;29(9):2769-78.
- Rocha B, Guy-Grand D, Vassalli P. *Extrathymic T cell differentiation*. Curr Opin Immunol. 1995;7(2):235-42.
- Romagnani P, Annunziato F, Baccari MC, Parronchi P. *T cells and cytokines in Crohn's disease*. Curr Opin Immunol. 1997;9(6):793-9.
- Russel MG, Stockbrugger RW. *Epidemiology of inflammatory bowel disease: an update*. Scand J Gastroenterol. 1996;31(5):417-27.
- Saha K, Sova P, Chao W, Chess L, Volsky DJ. *Generation of CD4+ and CD8+ T-cell clones from PBLs of HIV-1 infected subjects using herpesvirus saimiri*. Nat Med. 1996;2(11):1272-5.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha*. J Exp Med. 1994; 179(4):1109-18.
- Sandler RS, Sandler DP, McDonnell CW, Wurzelmann JI. *Childhood exposure to environmental tobacco smoke and the risk of ulcerative colitis*. Am J Epidemiol. 1992; 135(6):603-8.
- Satsangi J, Parkes M, Jewell DP, Bell JI. *Genetics of inflammatory bowel disease*. Clin Sci. 1998;94(5):473-8.
- Saxon A, Sanan F, Landers C, Ganz T, Targan S. *A subset of antineutrophil anticytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel disease*. J. Allergy Clin Immunol 1990; 86:202-10.
- Schreiber S, Raedler A, Stenson WF, MacDermott RP. *The role of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease*. Gastroenterol Clin North Am. 1992;21(2):451-502.
- Schwarz A, Tutsch E, Ludwig B, Schwarz EC, Stallmach A, Hoth M. *Ca<sup>2+</sup> signaling in identified T-lymphocytes from human intestinal mucosa. Relation to hyporeactivity, proliferation, and inflammatory bowel disease*. J Biol Chem. 2004;279(7):5641-7. Epub 2003 Oct 29.
- Seegert D, Rosenstiel P, Pfahler H, Pfefferkorn P, Nikolaus S, Schreiber S. *Increased expression of IL-16 in inflammatory bowel disease*. Gut. 2001;48(3):326-32.
- Seibold F, Weber P, Klein R, Berg P, Wiedman K.H. *Clinical significance of antibodies against neutrophils in patients with inflammatory bowel disease and primary sclerosing cholangitis*. Gut 1992;33:657-62.
- Selby WS, Janossy G, Bofill M, Jewell DP. *Intestinal lymphocyte subpopulations in inflammatory bowel disease: an analysis by immunohistological and cell isolation techniques*. Gut. 1984;25(1):32-40.
- Shanahan F. *Crohn's disease*. Lancet. 2002; 359(9300):62-9.
- Shortman K, Liu YJ. *Mouse and human dendritic cell subtypes*. Nat Rev Immunol. 2002;2(3):151-61.

- Shreedhar VK, Kelsall BL, Neutra MR. *Cholera toxin induces migration of dendritic cells from the subepithelial dome region to T- and B-cell areas of Peyer's patches*. Infect Immun. 2003;71(1):504-9.
- Simmer B, Alt M, Buckreus I, Berthold S, Fleckenstein B, Platzer E, Grassmann R. *Persistence of selectable herpesvirus saimiri in various human haematopoietic and epithelial cell lines*. J Gen Virol. 1991;72 (Pt 8):1953-8.
- Stevens C, Lipman M, Fabry S, Moscovitch-Lopatin M, Almawi W, Keresztes S, Peppercorn MA, Strom TB. *5-Aminosalicylic acid abrogates T-cell proliferation by blocking interleukin-2 production in peripheral blood mononuclear cells*. J Pharmacol Exp Ther. 1995; 272(1):399-406.
- Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. *The immunology of mucosal models of inflammation*. Annu Rev Immunol. 2002;20:495-549.
- Suzuki A, Sugimura K, Ohtsuka K, Hasegawa K, Suzuki K, Ishizuka K, Mochizuki T, Honma T, Narisawa R, Asakura H. *Fas/Fas ligand expression and characteristics of primed CD45RO+ T cells in the inflamed mucosa of ulcerative colitis*. Scand J Gastroenterol. 2000;35(12):1278-83.
- Te Velde AA, van Kooyk Y, Braat H, Hommes DW, DelleMijn TA, Slors JF, van Deventer SJ, Vyth-Dreese FA. *Increased expression of DC-SIGN+IL-12+IL-18+ and CD83+IL-12-IL-18- dendritic cell populations in the colonic mucosa of patients with Crohn's disease*. Eur J Immunol. 2003;33(1):143-51.
- Teig N, Moses D, Gieseler S, Schauer U. *Age-related changes in human blood dendritic cell subpopulations*. Scand J Immunol. 2002;55(5):453-7.
- Thornton AM, Shevach EM. *Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific*. J Immunol. 2000 Jan 1; 164(1):183-90.
- Tomasi TB. *Introduction: An overview of the mucosal immune system*. En: *Handbook of Mucosal Immunology*. Edited by: Ogra PL, Lamm ME, McGheeJR, Mestecky J, Strober W, Bienenstock J. 1994. Ed. Academic Press. 3-8.
- Turley SJ. *Dendritic cells: inciting and inhibiting autoimmunity*. Curr Opin Immunol. 2002;14(6):765-70.
- Uhlig HH, Powrie F. *Dendritic cells and the intestinal bacterial flora: a role for localized mucosal immune responses*. J Clin Invest. 2003;112(5):648-51.
- Valeri AP, Perez-Blas M, Gutierrez A, Lopez-Santalla M, Aguilera N, Rodriguez-Juan C, Sala-Silveira L, Martin J, Lasa I, Muguerza JM, Lopez A, Garcia-Sancho L, Granell J, Martin-Villa JM. *Intrinsic defects explain altered proliferative responses of T lymphocytes and HVS-derived T-cell lines in gastric adenocarcinoma*. Cancer Immunol Immunother. 2003;52(11):708-14.
- Vieira PL, de Jong EC, Wierenga EA, Kapsenberg ML, Kalinski P. *Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction*. J Immunol. 2000;164(9):4507-12.
- Viola A. *The amplification of TCR signaling by dynamic membrane microdomains*. Trends Immunol. 2001;22(6):322-7.
- Vuckovic S, Florin TH, Khalil D, Zhang MF, Patel K, Hamilton I, Hart DN. *CD40 and CD86 upregulation with divergent CMRF44 expression on blood dendritic cells in inflammatory bowel diseases*. Am J Gastroenterol. 2001;96(10):2946-56.
- Warrington KJ, Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ. *CD28 loss in senescent CD4+ T cells: reversal by interleukin-12 stimulation*. Blood. 2003;101(9):3543-9.
- Weber F, Meinel E, Drexler K, Czlonkowska A, Huber S, Fickenscher H, Muller-Fleckenstein I, Fleckenstein B, Wekerle H, Hohlfeld R. *Transformation of human T-cell clones by Herpesvirus saimiri: intact antigen recognition by autonomously growing myelin basic protein-specific T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(23):11049-53.
- Weiner HL, van Rees EP. *Mucosal tolerance*. Immunol Lett. 1999;69(1):3-4.
- Weiss A, Littman DR. *Signal transduction by lymphocyte antigen receptors*. Cell. 1994;76(2):263-74.
- Whorwell PJ, Holdstock G, Whorwell GM, Wright R. *Bottle feeding, early gastroenteritis, and inflammatory bowel disease*. Br Med J. 1979;1(6160):382.
- Yamasaki S, Takamatsu M, Iwashima M. *The kinase, SH3, and SH2 domains of Lck play critical roles in T-cell activation after ZAP-70 membrane localization*. Mol Cell Biol. 1996;16(12):7151-60.
- Yang H, McElree C, Roth MP, Shanahan F, Targan SR, Rotter JI. *Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews*. Gut. 1993;34(4):517-24.

Yssel H, de Waal Malefyt R, Duc Dodon MD, Blanchard D, Gazzolo L, de Vries JE, Spits H. *Human T cell leukemia/lymphoma virus type I infection of a CD4+ proliferative/cytotoxic T cell clone progresses in at least two distinct phases based on changes in function and phenotype of the infected cells.* J Immunol. 1989;142(7):2279-89.