

RESUMEN

La enfermedad celíaca (EC) es una patología crónica inflamatoria que se induce en pacientes genéticamente susceptibles tras la ingestión de gluten y que afecta la mucosa del intestino delgado. Este proceso inflamatorio parece ser iniciado por Linfocitos T CD4+ de la lámina propia específicos de gluten y por el desarrollo de Ac's anti Transglutaminasa. La patología también se asocia a un incremento de Linfocitos Intraepiteliales (IELs). Los IELs son células CD8+ TCR $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ que expresan la integrina $\alpha E(CD103)\beta 7$. Si bien podrían tener actividad anti-tumoral, reconocer antígenos virales, participar en el mantenimiento de la homeostasis y ejercer actividades supresoras, se desconoce su verdadero rol fisiológico, tanto en la mucosa normal como patológica. El incremento de IELs en la enfermedad celíaca sugiere un papel en el proceso de destrucción del epitelio o en su regulación.

El objeto de este trabajo ha sido determinar las características fenotípicas y funcionales de IELs $\alpha\beta$ CD8+ y $\gamma\delta$ expandidos in vitro a partir de biopsias provenientes de pacientes celíacos y de donantes no celíacos. Dicha caracterización comprendió el estudio del perfil de citoquinas tras estimulación in vitro del TCR, de los patrones de reconocimiento frente a células epiteliales y la búsqueda de marcadores de membrana que nos permitiera identificar subtipos de IELs involucrados en el desarrollo de la enfermedad.

Los resultados muestran un importante grado de heterogeneidad dentro de las poblaciones de IELs $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$. El perfil de citoquinas indica que la producción de IL-10 e IL-2 por IELs $\alpha\beta$ CD8+ CD103+ específicos de epitelio estaría desbalanceado y jugaría un papel en el desarrollo de la enfermedad, ya que los clones CD son principalmente no productores de IL-10 pero secretan IL-2, contrariamente a lo que sucede con los clones no celíacos.

Las células $\gamma\delta$ muestran un perfil Th1/citotóxico asociado con una función regulatoria en algunos de los clones. Algunos clones $\gamma\delta$ reconocerían ligandos epiteliales expresados en condiciones de estrés. Otros mostraron un fenotipo diferente sin actividad citotóxica contra epitelio y síntesis de citoquinas regulatorias como IL-10, IL-4 e IL-5. Ninguno produjo IL-2 en contraste con IELs $\alpha\beta$ CD8+. El reconocimiento de células epiteliales estuvo mediado en muchos casos por el TCR y fue independiente de la interacción NKG2D/MICA. Dicha interacción sería importante en casos de celiaquía refractaria, como demuestran otros autores.

En conclusión, proponemos que en condiciones fisiológicas, los IELs CD8+ productores de IL-10 controlarían procesos inflamatorios esperados en la mucosa, como la síntesis de IL-2 y otros factores involucrados en la desestructuración de la matriz de la lámina propia. En la enfermedad celíaca, los IELs CD8+ productores de IL-2 estarían involucrados en el daño del epitelio. En cuanto a las células $\gamma\delta$, aquellas con reactividad epitelial participarían en el control de enterocitos estresados mientras que las células reguladoras, no citotóxicas, controlarían la homeostasis del epitelio.

SUMMARY

The development of celiac disease (CD), an autoimmune process induced by the exposure to gluten in susceptible individuals, results in the destruction of the small intestine epithelium, producing a characteristic flattening and atrophy of the villi. This inflammatory disorder appears to be initiated by gluten reactive lamina propria (LPL) CD4⁺ T cells and the development of tissue transglutaminase (TG2) specific autoantibodies. The pathology is also associated with an increase in the damaged mucosa of intraepithelial lymphocytes (IELs), both $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$. IELs are an epithelium-associated T cell population within the mucosal associated lymphoid tissue (MALT), characterized by the expression the specific integrin $\alpha E(CD103)\beta 7$ and composed by CD8⁺ TCR $\alpha\beta$ lymphocytes and $\gamma\delta$ T cells. Anti-tumor activity, infected cell recognition, homeostatic maintainance and supressor activity are functions that have been atributed to IELs subsets. Some IELs may recognize MHC-class I associated peptides while other non conventional IELs could recognize non polymorphic epithelial ligands. In any case, the physiological function of the IELs in the normal intestine is not yet defined. Increased IEL numbers in celiac disease suggest that they may play a role in the destruction of the epithelium layer or in the regulation of the process, but that role is still unknown.

The aim of this work was the functional and phenotypical characterization of *in vitro* expanded $\alpha\beta$ CD8⁺ and $\gamma\delta$ T cell clones isolated from biopsies from celiac disease patients (CD) and from donors that later did not reveal celiac disease (non-CD). Such characterization included cytokine profile analysis after *in vitro* TCR activation, cytotoxicity patterns against epithelial cell targets and the search of membrane markers that could help to identify IELs subsets involved in the development of the disease.

Results showed an important degree of heterogeneity within $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ IELs, both for cytokine secretion profiles and cytotoxic activity. Clonal analysis of cytokine production by celiac $\alpha\beta$ CD8⁺ CD103⁺ T cell clones indicated that production of IL-10 and IL-2 by epithelium-specific IELs may be unbalanced and involved in the celiac disease outcome, since CD clones were mostly non-IL10 producers but secreted IL-2, with the opposite pattern in non-CD clones. The $\gamma\delta$ IEL population showed a clear Th1/cytotoxic profile associated with a possible regulatory function in some of the clones. Some of the $\gamma\delta$ cells may be involved in the recognition of an unknow stress-related epithelial ligand. Other $\gamma\delta$ T cells showed a different phenotype without cytotoxic activity against epithelial cells and synthesis of regulatory IL-10, IL-4 or IL-5 cytokines. None of the $\gamma\delta$ cells produced IL-2 in contrast with CD8⁺ $\alpha\beta$ IELs. Epithelial recognition by $\gamma\delta$ IELs was mediated by TCR and independent of NKG2D, in contrast with recently published data. As for the CD8⁺ cells, the expression of NKG2D did not correlate with cytotoxic patterns. The role of MIC/NKG2D interaction could be limited to cases of refractory celiac disease.

In conclusion, we propose that in physiological conditions, IL-10 producing CD8⁺ IELs may control inflammatory processes normally expected in the mucosa, as well as IL-2 synthesis and other factors involved in lamina propia matrix degradation. In celiac disease, increased IL-2 CD8⁺ IELs may be involved in epihelial cell damage. As for $\gamma\delta$ cells, epithelial reactive cells may participate in the control of stressed enterocytes whereas regulatory, non citotoxic $\gamma\delta$ T cells may control the epithelial homeotasis.