



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Equilibri entre la resposta immunitària efectora i
reguladora a l'intestí humana i inflamada.**

Relació amb la localització i el tipus de malaltia.



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència ***Reconeixement- Compartiguem 3.0. Espanya de Creative Commons.***

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia ***Reconocimiento - Compartir Igual 3.0. España de Creative Commons.***

This doctoral thesis is licensed under the ***Creative Commons Attribution-ShareAlike 3.0. Spain License.***



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**EQUILIBRI ENTRE LA RESPOSTA IMMUNITÀRIA EFECTORA
I REGULADORA A L'INTESTÍ HUMÀ SA I INFLAMAT.
RELACIÓ AMB LA LOCALITZACIÓ I EL TIPUS DE
MALALTIA.**

TESI PRESENTADA PER

Anna Carrasco García

Per a obtenir el títol de doctor en biomedicina per la

Universitat de Barcelona

DIRIGIDA PER

Maria Esteve Comas i Fernando Fernández-Bañares



**Fundació de
Docència i Recerca**
Mútua Terrassa

MARIA ESTEVE COMAS, Doctora en Medicina i Cirurgia, i Professora de Medicina associada a la Universitat de Barcelona i FERNANDO FERNÁNDEZ BAÑARES, Doctor en Medicina i Cirurgia

CERTIFIQUEN

Que ANNA CARRASCO GARCIA ha realitzat sota la seva direcció la Tesi Doctoral titulada " EQUILIBRI ENTRE LA RESPOSTA IMMUNITÀRIA EFECTORA I REGULADORA A L'INTESTÍ HUMÀ SA I INFLAMAT. RELACIÓ AMB LA LOCALITZACIÓ I EL TIPUS DE MALALTIA" i que reuneix els requisits científics necessaris per a ser defensada davant d'un tribunal per a optar al grau de Doctor en Biomedicina.

Terrassa, Juny 2016

Maria Esteve Comas

Directora

Fernando Fernández Bañares

Director

a la Fina Mallolas

gràcies per tot

*Nobody said it was easy
No one ever said it would be this hard
I'm going back to the start*

The scientist (Coldplay)

GRÀCIES A

ÍNDEX DE CONTINGUTS

GRÀCIES A	11
ÍNDEX DE CONTINGUTS	13
ÍNDEX DE FIGURES	16
ÍNDEX DE TAULES	16
ABREVIATURES	17
INTRODUCCIÓ	19
IMMUNOLOGIA DE LA MUCOSA INTESTINAL	21
La Mucosa Intestinal	21
Estructura de l'intestí	21
Organització del sistema immunitari de les mucoses	23
Homeòstasi intestinal	23
Especialització regional del sistema immunitari intestinal	27
Compartimentalització de la microbiota i del contingut de la llum intestinal	27
Compartimentalització de la capa de mucus intestinal	29
Compartimentalització de l'epiteli	30
Compartimentalització de les cèl·lules de la làmina pròpia	31
MALALTIA INFLAMATÒRIA INTESTINAL	33
ASPECTES CLÍNICS	33
Malaltia de Crohn	33
Colitis Ulcerosa	35
Diagnòstic diferencial. Colitis indeterminada	35
TRACTAMENT	38
Tractament de la MCrohn	38
Tractament de la CU	41

FISIOPATOLOGIA _____	43
Genètica _____	45
Factors reguladors de l'expressió gènica: epigenètica i miRNAs _____	46
Microbiota _____	46
Sistema immunitari innat _____	47
Sistema immunitari adaptatiu _____	47
COLITIS MICROSCÒPICA _____	53
ASPECTES CLÍNICS _____	53
FACTORS DE RISC I MALALTIES ASSOCIADES _____	54
Tabaquisme _____	54
Ingesta de fàrmacs _____	54
Malabsorció d'àcids biliars _____	54
Malalties autoimmunitàries _____	54
CRITERIS PER AL DIAGNÒSTIC HISTOLÒGIC _____	55
Troballes comunes a CC i CL _____	55
Criteris específics per al diagnòstic de CC _____	55
Criteris específics per al diagnòstic de CL _____	55
TRACTAMENT _____	56
FISIOPATOLOGIA DE LA CM _____	56
Factors genètics _____	57
Factors luminals _____	57
Alteracions de la resposta immunitària innata _____	58
Alteracions resposta immunitària adquirida _____	60
Paral·lelismes amb la malaltia celíaca _____	62
Alteracions en la funció fibroblàstica i el metabolisme del col·lagen _____	62
Sistema nerviós entèric _____	63
CC i CL: són la mateixa malaltia? _____	63
La CM forma part de l'espectre de la MII? _____	64
OBJECTIUS _____	67
RESULTATS _____	71
ESTUDI 1: _____	73
ESTUDI 2: _____	95

RESUM DE RESULTATS I DISCUSSIÓ GLOBAL	109
Equilibri Th17/Treg a la mucosa sana	111
En condicions d'inflamació els patrons Th1/Th17 són específics de malaltia	112
L'increment de Treg és un marcador inespecífic d'inflamació crònica intestinal	114
Major freqüència de limfòcits Doble Positiu CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ a l'íleum sa i inflammat	116
Els limfòcits Doble Negatiu CD3 ⁻ CD4 ⁻ CD8 ⁻ podrien tenir un paper en la fisiopatologia d'algunes malalties inflamatòries intestinals	117
L'aclariment de limfòcits per apoptosi s'incrementa en sentit distal a la mucosa intestinal sana	118
Tots els tipus d'inflamació del còlon, incloent les formes més lleus, presenten una menor apoptosi en comparació amb el còlon sa	119
La taxa d'apoptosi de limfòcits a la Malaltia de Crohn depèn de la localització de la inflamació	120
Els patrons específics de malaltia no es veuen reflectits a sang perifèrica	120
La colitis microscòpica presenta un bloqueig dels mecanismes proinflamatoris	121
Colitis col·làgena i colitis limfocítica: dues malalties molt relacionades però independents	122
Limitacions de l'estudi	124
CONCLUSIONS	127
BIBLIOGRAFIA	131
ANNEXES	145
ANNEX 1. Aspectes metodològics	147
ANNEX 2. Fonts de finançament	163
ANNEX 3. Llicències per a l'ús de figures	165
ANNEX 4. Comunicacions a congressos internacionals relacionades amb la tesi	169

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. Estructura de la mucosa intestinal. Budell sa (còlon). Tinció hematoxilina i eosina (20x).	22
Figura 2. Compartimentalització de la microbiota al llarg de l'intestí.	28
Figura 3. Diferències topogràfiques en l'estructura de la capa de mucus intestinal.	29
Figura 4. Característiques microscòpiques i macroscòpiques de la MII.	37
Figura 5. Tractament de la MCrohn amb patró inflamatori (<i>step care</i> convencional).	39
Figura 6. Factors immunitaris i no immunitaris implicats en la fisiopatologia de la MII.	44
Figura 7. Algorisme de tractament de la colitis microscòpica activa	56

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1. Classificació de Montreal per a la Malaltia de Crohn [24]	34
Taula 2. Característiques clíniques de la MC i la CU. Taula cedida per Dra. Maria Esteve.	36
Taula 3. Hjorstwang-Criteria: Definició d'activitat clínica per a la CC [88]	53

ABREVIATURES

CC Colitis col·làgena

CI Colitis infecciosa

CL Colitis limfocítica

CM Colitis microscòpica

CU Colitis ulcerosa

IC Interval de Confiança

IFN- γ Interferon γ

IL Interleucina

iNOS Òxid Nítric sintasa induïble

LIE Limfòcit intraepitelial

LP Làmina pròpia

LPL Limfòcit de làmina *propria*

LPMC *Lamina propria mononuclear cell*

MALT *Mucosal associated lymphoid tissues*

MCrohn Malaltia de Crohn

MFI *Median Fluorescence Intensity*

MHC *Major Histocompatibility Complex*

MII Malaltia inflamatòria intestinal

mRNA RNA missatger

NK *Natural Killer Cell*

NK T *Natural Killer T Cell*

NO Òxid nítric

PBMC *Peripheral Blood Mononuclear Cel*

PRR *Pathogen-recognition receptor*

RNA *Ribonucleic acid*

Tc Limfòcit T citotòxic

TGF- β *Transforming Growth Factor β*

Th Limfòcit T *helper*

Th1 Limfòcit Th tipus 1

Th17 Limfòcit Th tipus 17

TLR *Toll-like receptors*

TREC *T cell Receptor Excision Circle*

Treg Limfòcit T regulador

INTRODUCCIÓ

*No organ in the body is so misunderstood,
so slandered and maltreated as the colon*

Hurst AF. The unhappy colon. Lancet 1935. 225:1483-1487

IMMUNOLOGIA DE LA MUCOSA INTESTINAL

La Mucosa Intestinal

L'intestí conté el nombre de cèl·lules del sistema immunitari més gran de tot l'organisme i pateix una exposició contínua a una gran varietat d'antígens i elements immunomoduladors, tant beneficiosos (dieta i microbiota comensal) com potencialment perillosos (microbiota patògena). El sistema immune del tracte digestiu té la complicada tasca de mantenir un delicat equilibri entre les respostes reguladores (antiinflamatòries) i efectores (proinflamatòries), que permetin mantenir la tolerància en front d'antígens beneficiosos o innocus i alhora respondre de manera adequada als antígens perillosos. El contingut de la llum intestinal modifica de manera contínua el funcionament del sistema immunitari intestinal, que influeix en els processos fisiològics i patològics a tot l'organisme, dins i fora del tracte gastrointestinal [1].

Estructura de l'intestí

El budell prim i el còlon formen un tub continu des de l'estómac fins a l'anús, amb diversos esfínters interposats, que contribueixen a la seva compartimentalització. A la llum del tub es troba la microbiota, separada de la mucosa per una capa de mucus que constitueix una barrera tant física com immunològica. La mucosa intestinal està formada per l'epiteli i la làmina pròpia (LP) i és a on es produeixen la gran majoria de processos del sistema immunitari [1] (figura 1).

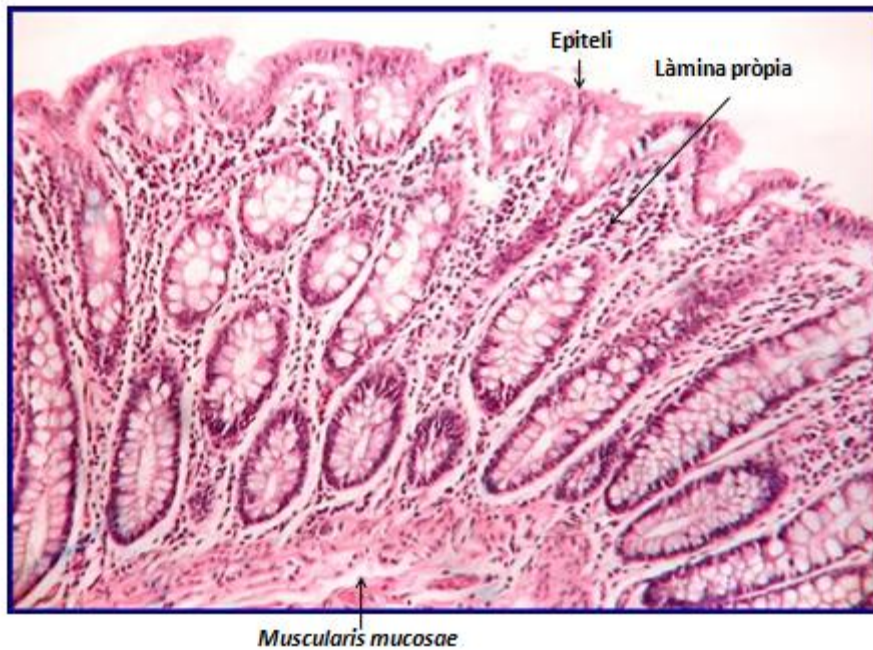


Figura 1. Estructura de la mucosa intestinal. Budell sa (còlon). Tinció hematoxilina i eosina (20x).

L'epiteli està format per una monocapa d'epiteli columnar simple, separat per una làmina o membrana basal estreta i porosa de la LP subjacent. La monocapa epitelial, formada per enteròcits, cèl·lules M, cèl·lules de Paneth, cèl·lules caliciformes (*goblet cells*) i cèl·lules enteroendocrines, està polaritzada i estretament unida per unions estretes (*tight junctions*), formant una barrera selectiva i molt ben regulada que controla la permeabilitat intestinal. Malgrat que l'epiteli s'ha considerat clàssicament com una mera barrera física, actualment sabem que és crucial en el manteniment de l'homeòstasi intestinal [2]. La LP és una capa de teixit connectiu format per cèl·lules musculars llises, fibroblasts, vasos sanguinis i limfàtics i conté múltiples cèl·lules del sistema immunitari innat i adaptatiu: limfòcits T, B, cèl·lules plasmàtiques, neutròfils i cèl·lules presentadores d'antigen (macròfags i cèl·lules dendrítiques). La *muscularis mucosae* és una capa muscular llisa prima que es troba a sota de la LP i separa la mucosa de la submucosa. Alhora, dues capes musculars (longitudinals i transversals), responsables del peristaltisme, se situen per sota de la submucosa. La última capa, denominada serosa, aïlla i separa l'intestí de la cavitat peritoneal.

Organització del sistema immunitari de les mucoses

Els elements del sistema immune de la mucosa intestinal (*Mucosal Associated Lymphoid Tissues; MALT*) es poden subdividir funcionalment en dues parts:

1) Teixit organitzat: que constitueix el lloc d'inducció de la resposta immunitària. Les plaques de Peyer són visibles macroscòpicament i es troben a la submucosa del budell prim. La seva mida i freqüència s'incrementa en sentit distal, essent rares a duodè i especialment abundants a l'íleon terminal. En canvi, els nòduls limfàtics i mesentèrics i els fol·licles limfoides aïllats, es poden trobar al llarg de tot l'intestí, malgrat són més freqüents al colon i al recte.

2) Teixit difús, on es produeix la resposta immune efectora, constituït per cèl·lules associades a la LP (*lamina propria mononuclear cells, LPMC*) i a l'epiteli intestinal (que conté els limfòcits intraepitelials, LIEs).

Els antígens luminals són contínuament captats i rastrejats mitjançant diferents mecanismes: a través de les cèl·lules M epitelials, per captació activa per les cèl·lules presentadores d'antigen que treuen prolongacions a la llum, per fagocitosis de les cèl·lules epitelials (que mantenen una comunicació permanent amb les cèl·lules presentadores d'antigen del domini subepitelial), o per entrada directa a través de les vies paracel·lulars de l'epiteli. La presentació antigènica a les cèl·lules T, en general, es produeix als llocs d'inducció (teixit organitzat) i el tipus de resposta (reguladora o inflamatòria) dependrà sobretot de dos factors: el subtipus i el grau d'activació de la cèl·lula presentadora d'antigen que inicia la resposta i de l'ambient local (nivells de citocines i altres mediadors inflamatoris).

Homeòstasi intestinal

L'homeòstasi intestinal depèn bàsicament de dos factors: la integritat de la barrera epitelial i de l'equilibri entre les cèl·lules efectoras i reguladores de la mucosa. El primer factor està fora de l'abast d'aquesta tesi.

- **Resposta immunitària efectora: cèl·lules Th1 i Th17**

Les cèl·lules efectores Th CD4⁺ mostren una gran heterogeneïtat funcional i alhora són extremadament "plàstiques", és a dir, poden intercanviar fenotips en funció dels estímuls ambientals per adaptar les seves funcions a les necessitats de cada moment. La resposta immunitària inflamatòria intestinal està mediada, sobretot per Th1 i Th17. Les cèl·lules Th1 tenen poca presència a la mucosa intestinal sana i per aquest motiu, s'analitzen amb més detall a l'apartat de la fisiopatologia de la malaltia inflamatòria intestinal.

Les cèl·lules Th17 es diferencien a partir de Th0 en presència de IL-23 i sintetitzen citocines amb activitat proinflamatòria (IL-17-A, IL-17-F, IL-21, IL-22 i IL-26). A més de funcions proinflamatòries també afavoreixen el manteniment de la integritat de la barrera epitelial, ja que IL-17-A, IL-17-F i IL-22 indueixen l'expressió de defensines, mucines i proteïnes constituents de les "tight junctions" [3, 4]

- **Resposta immunitària reguladora: cèl·lules Treg**

Les cèl·lules Treg (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) es classifiquen en Treg naturals (nTreg) i Treg induïdes (iTreg). Les nTreg deriven directament del timus i arriben a la perifèria amb el fenotip regulador desenvolupat, mentre que les iTreg es desenvolupen *in situ* al lloc d'inducció a partir de limfòcits CD4⁺ *naïve*. Tot i que les cèl·lules nTreg i iTreg són indistingibles fenotípicament es considera que al budell la generació *in situ* de iTreg és predominant i essencial per al desenvolupament de tolerància oral en front els antígens de la dieta i de la flora comensal. Per al desenvolupament de iTreg a partir de cèl·lules CD4⁺ *naïve* és imprescindible un ambient ric en TGF-β [5, 6] i en àcid retinoic, un metabòlit de la vitamina A [7]

- **Nous actors. Limfòcits atípics i cèl·lules limfoides innates**

A més de les poblacions de limfòcits "clàssics" descrits, la mucosa intestinal és especialment rica en cèl·lules denominades "atípiques o poc convencionals". La seva

distribució i funcionalitat tant en la mucosa sana com a les diferents patologies intestinals és, de moment, desconeguda.

- **Limfòcits doble positius (DP, CD3⁺CD4⁺CD8⁺)**

Segons les teories vigents sobre el desenvolupament de limfòcits T al timus, no haurien d'existir les cèl·lules DP a la perifèria. La realitat és que es detecten aquestes cèl·lules en baixa proporció en controls sans i incrementades en diferents patologies autoimmunitàries. Sembla que les DP, per la seva funcionalitat són la diana preferida per a la infecció del virus de la immunodeficiència humana (VIH) i del virus de la immunodeficiència dels simis (VIS), constituint el reservori víric més important. No està clar ni quin és el seu origen ni la seva funció. Estudis recents descriuen tres subtipus diferents de DPs: CD4^{high}CD8αα; CD4^{high}CD8αβ; CD4^{low}CD8αβ i sembla que les diferències fenotípiques en intensitat i tipus de co-receptors que expressen es corresponen amb diferents orígens cel·lulars, es a dir CD4⁺ que adquireix posteriorment el marcador CD8⁺ o *viceversa* [8]. En el mico *Rhesus Macaca mulata* s'han detectat fins a un 20% de cèl·lules DP sobre el total de limfòcits T de la LP de jejú. Presenten un fenotip de memòria (CD45RA⁻), tant memòria central (CD28⁺CD95⁺) com memòria efectora (CD28⁻CD95⁺), en contrast amb les de sang o nòduls limfàtics que presenten un fenotip naïve (CD45RA⁺). Les DP intestinals de jejú després d'activació *in vitro* amb PMA/Ionomicina produeixen TNF-α, IFN-γ i MIP-1β, exercint per tant una funció proinflamatòria [9]. Estudis murins demostren l'existència d'una població intraepitelial CD8αα que podria ser important en malalties digestives. S'originen a partir de cèl·lules CD4⁺ intraepitelials per la presència de IL-4 i produeixen grans quantitats d'IL-10, prevenint l'aparició o disminuint la gravetat de la malaltia inflammatòria intestinal en determinats models experimentals [10]. Cèl·lules amb un fenotip similar a aquest s'han descrit en mucosa intestinal humana, i es troben reduïdes a la mucosa de pacients amb malaltia de Crohn (MCrohn) i colitis ulcerosa (CU) [11]. Aquestes evidències de models animals

suggereixen que l'origen, el fenotip i la funcionalitat de les cèl·lules DP és diferent segons la localització a la mucosa (LP o epiteli).

- **Limfòcits doble negatiu (DN, CD3⁺CD4⁻CD8⁻)**

El seu estudi és especialment complex, ja que sota el fenotip DN podem trobar múltiples subtipus cel·lulars, com les Mucosal Associated Invariant T cells (cèl·lules MAIT), cèl·lules NK-T convencionals (que ahora es poden subdividir en invariants, iNK-T o de mucosa, mNK-T) i cèl·lules TCR $\gamma\delta^+$.

En sang perifèrica de controls sans la proporció de DNs és molt baixa (4% respecte al total de limfòcits T CD3⁺), essent aquests majoritàriament TCR $\gamma\delta^+$ (3.2%), i en menor grau TCR $\alpha\beta^+$ (0.9%)[12]. En canvi, en nòduls limfàtics de donants sans s'inverteix la proporció: les DN TCR $\alpha\beta^+$ representen un 2% de la cel·lularitat total mentre que les TCR $\gamma\delta^+$ són pràcticament inexistentes. En la resta del cos, les DN representen una proporció elevada a pulmó, fetge, ronyó i tracte reproductor. Actualment no es disposa d'estudis que hagin avaluat la seva presència i funcionalitat en mucosa intestinal sana o inflamada.

- ***Innate Lymphoid Cells (ILC)***

Les cèl·lules ILC s'han descobert recentment i podrien ser molt importants per a la regulació de l'homeòstasi intestinal. Juntament amb les cèl·lules presentadores d'antigen, les ILC probablement contribueixen a la interfase entre immunitat innata i adquirida. Les cèl·lules ILC no tenen els marcadors de superfície convencional dels leucòcits (cèl·lules "llinatge negatives": CD3⁻, CD1a⁻, CD11c⁻, CD34⁻, CD123⁻, TCR $\alpha\beta^-$, TCR $\gamma\delta^-$, BDCA2⁻, CD19⁻, CD14⁻, CD16⁻). Al no tenir cap tipus de TCR la seva resposta no està condicionada a cap restricció antigènica i està probablement condicionada a patrons genèrics (com les cèl·lules del sistema immunitari innat convencionals). Es subdivideixen en tres categories, que "imiten" a les subpoblacions clàssiques de la immunitat adaptativa (ILC1=Th1, ILC2=Th2, ILC3=Th17 i

NK=Tc). Sembla que les ILC3 són les majoritàries a la mucosa intestinal sana i contribueixen al manteniment de la funció barrera, mentre que el subtipus de ILC1 podrien tenir un paper a la fisiopatologia d'algunes malalties digestives.

Especialització regional del sistema immunitari intestinal

El tracte digestiu consta de múltiples compartiments que difereixen entre sí tant a nivell anatòmic com funcional. La càrrega antigènica és variable, amb predomini d'antígens alimentaris al budell prim, per als quals es requereix la generació de tolerància oral, mentre que la càrrega procedent de la microbiota és màxima al còlon, en front de la qual es necessita una tolerància envers els simbionts i alhora una resposta mesurada però efectiva en front els potencials patògens. Aquest estret balanç provoca que l'intestí es mantingui en un estat d' "inflamació fisiològica" constant i molt ben regulada. El sistema immune de cada compartiment està especialitzat i permet donar una resposta adequada al contingut de la llum de cadascun dels segments. La major part d'estudis sobre la fisiopatologia de les malalties inflamatòries intestinals han ignorat els fenòmens de "compartimentalització" i especialització regional de la immunitat mucosa. El coneixement d'aquestes diferències regionals és essencial per a l'estudi de patologies que poden afectar a qualsevol regió del tub, com és el cas de la MCrohn.

Compartimentalització de la microbiota i del contingut de la llum intestinal

La composició de la microbiota varia en quantitat i diversitat al llarg del tub digestiu (figura 2) [1]. A l'estómac, per les condicions d'acidesa i el breu temps de trànsit del bolus, la diversitat existent és molt baixa [13]. A l'intestí prim, la quantitat i diversitat bacteriana s'incrementa de manera distal, essent màxima a l'íleon terminal[13].

La llum del colon suporta la màxima càrrega i el nombre de bacteris s'incrementa de manera distal. Malgrat hi ha un major nombre de bacteris al colon

distal, la diversitat d'espècies i l'activitat metabòlica és superior al còlon proximal i assolix el màxim al cec. Aquest fenomen probablement és degut a una major disponibilitat de substrats metabòlics per al metabolisme bacterià en regions proximals [13].

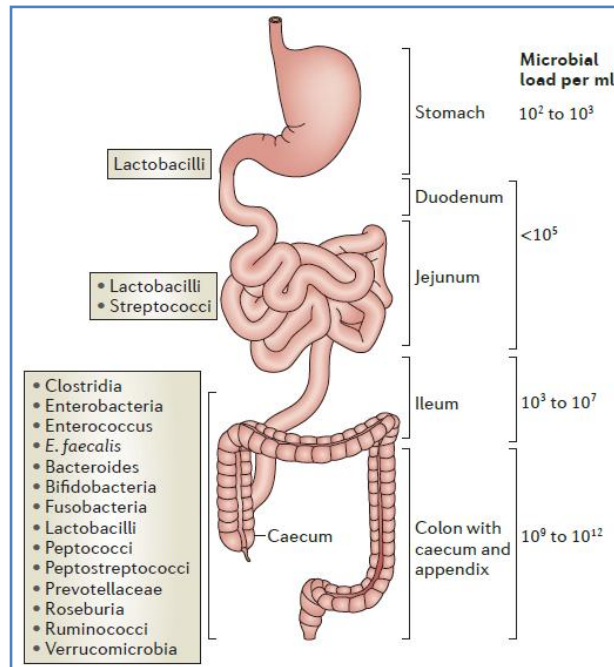


Figura 2. Compartimentalització de la microbiota al llarg de l'intestí. Reimprès amb permís de Macmillan Publishers LTD: Mowat i Agace, Nature reviews (copyright 2014) [1].

Les cèl·lules de l'epiteli intestinal posseeixen "sensors" de patrons moleculars associats a patògens denominats receptors de reconeixement de patògens (PRR, *Pathogen-recognition receptor*), essent els més estudiats els tipus *Toll-like receptors* (TLR). Per tant, si hi ha canvis en la composició de la població bacteriana resident al llarg del tub digestiu, és esperable que els patrons de TLRs o altres PRR també variïn en concordança. Estudis amb models murins demostren que TLR4 és més freqüent a colon que a íleum i que la freqüència de TLR2 es comporta de manera oposada, decreixent en sentit distal [14]. No es disposa d'estudis que hagin avaluat aquests paràmetres a la mucosa humana.

La resposta immunitària de l'intestí està modulada tant per components estructurals de la microbiota com pels productes del seu metabolisme. Els àcids grassos de cadena curta (*short-chain fatty acids*, SCFAs: butirat, acetat, propionat) són

productes del metabolisme anaeròbic que tenen influència sobre les cèl·lules del sistema immunitari. La seva concentració augmenta en paral·lel amb el contingut bacterià del còlon en direcció distal [1].

Al budell prim en canvi, són molt més importants els antígens procedents de la dieta. D'altra banda alguns micronutrients poden tenir efectes directes sobre la immunitat, com per exemple l'àcid retinoic, un derivat de la vitamina A, té importants efectes sobre la funcionalitat de les cèl·lules dendrítiques i les cèl·lules Treg, entre altres. La seva quantitat present a la llum es redueix de manera distal, essent màxima al duodè i mínima a l'ili [1].

Compartimentalització de la capa de mucus intestinal

La capa de mucus intestinal es forma per secrecions procedents de l'epiteli i constitueix la primera línia de defensa de l'organisme. La seva composició i estructura és variable al llarg del tracte digestiu per tal d'adaptar-se a les particularitats de cada segment [15]. A la figura 3 es mostra una representació esquemàtica de les diferents estructures que formen la capa de mucus al llarg del tracte gastrointestinal.

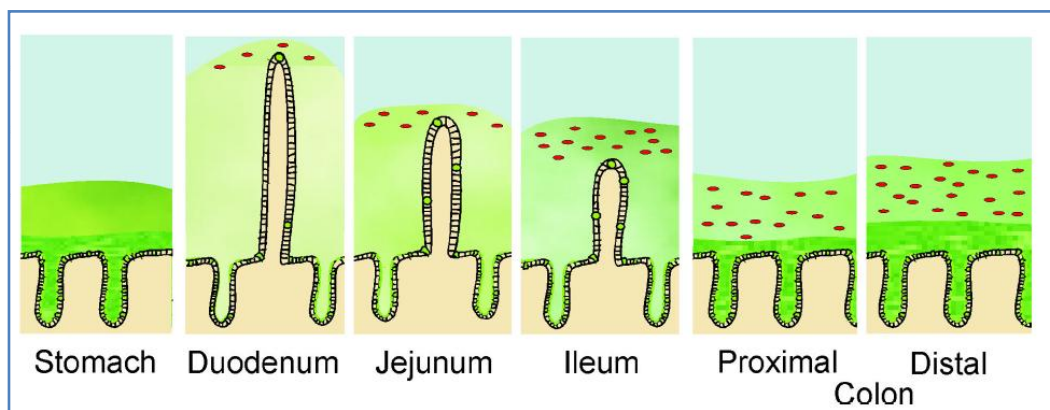


Figura 3. Diferències topogràfiques en l'estructura de la capa de mucus intestinal. Reimprès amb permís de Wiley Company, extret de Pelayesed P, et al, Immunol Rev, 2014 [16].

A l'estómac la concentració de bacteris és molt baixa i la funció principal de la capa de mucus és protectora per a evitar l'autodigestió. A l'intestí prim, la capa de mucus és laxa i no està ancorada a l'epiteli, i es desplaça en sentit distal amb el peristaltisme. Per aquesta raó s'acumulen els bacteris a la regió ileal. El mucus del budell prim conté productes antimicrobians (lisozima, Reg-III- γ , etc) que són sintetitzats per les cèl·lules de Paneth [16].

Al colon la capa de mucosa és doble, composta per una capa interna (*inner layer*) que és estèril i impermeable a la microbiota, i una capa externa (*outer layer*) que és on habita la microbiota. S'especula que la pèrdua d'impermeabilització de la capa interna permet el contacte directe de la microbiota amb l'epiteli i pot constituir una causa primària del debut d'algunes malalties inflamatòries intestinals. La càrrega de flora comensal del còlon s'incrementa en direcció proximal→distal, i en conseqüència també ho fa el gruix de la capa de mucus associada, tal com s'observa a la figura 3 [16].

Compartimentalització de l'epiteli

L'estructura de les digitacions intestinals també es variable al llarg del tub digestiu. Les projeccions digitiformes característiques de l'intestí prim ("*villi*") s'escurcen des de l'intestí proximal a distal i són absents al còlon.

Les cèl·lules de Paneth es localitzen exclusivament a l'intestí prim, i són més abundants a l'íleon en comparació amb el duodè o el jejú [1]. La seva funció principal és antibacteriana, mitjançant la secreció de lisozima, defensines i REG-III- γ , i per tant s'acumulen allà on hi ha major quantitat de microbiota present (ili terminal, figura 3).

Les cèl·lules caliciformes es troben presents al llarg de tot l'intestí, essent més abundants al còlon (fins al 25% de cèl·lules epitelials totals) i menys freqüents al budell prim (10% o menys de cèl·lules epitelials totals). Les cèl·lules caliciformes són productores de mucus i l'augment en percentatge es produeix de manera proximal→distal, en paral·lel amb l'engruiximent de la capa protectora de mucus que es produeix en el mateix sentit (figura 3).

Els limfòcits intraepitelials (*Intraepithelial lymphocytes*, IELs) es localitzen junt a la membrana basal intercalats entre les cèl·lules epitelials. La freqüència en condicions normals decreix en sentit distal (valors normals a la mucosa sana: <20 IELs/100 cèl·lules epitelials al duodè i <8 IELs/100 cèl·lules epitelials al còlon). Tanmateix el seu fenotip també és variable, per exemple, a duodè, prop del 100% dels IELs expressen el marcador CD103 (integrina $\alpha E\beta 7$) mentre que els valors a còlon ronden el 30-40% [17]. Contràriament, la proporció de IELs que expressen el TCR- $\gamma\delta$ és molt baixa al duodè (5-10%) i s'incrementa en sentit distal, arribant fins al 40% al còlon [18].

Compartimentalització de les cèl·lules de la làmina pròpia

Hi ha relativament pocs estudis que hagin avaluat les diferències entre els subtipus cel·lulars dels diferents compartiments a la làmina pròpia de la mucosa intestinal humana. Els seus resultats demostren l'existència de grans diferències entre les diferents regions, probablement relacionades amb les diferències existents en el contingut de la llum intestinal.

El fenotip dels fagòcits mononuclears (macròfags i cèl·lules dendrítiques) és substancialment diferent entre compartiments. La localització d'aquestes cèl·lules és preferiblement al domini subepitelial i contribueixen a la captació i presentació d'antígens, i l'activació de limfòcits T i B. Les cèl·lules dendrítiques ileals mostren un patró més proinflamatori mentre que les del còlon són tolerogèniques [19]. Dins el còlon, també es detecten diferències remarcables entre regions. Les cèl·lules dendrítiques del còlon proximal (cec i ascendent) són més madures, produeixen més citocines i tenen una major capacitat estimuladora de limfòcits que les de còlon distal (descendent i sigma) [20].

La presència de cèl·lules plasmàtiques secretores de IgA també varia al llarg de l'intestí, essent més freqüents al còlon en comparació amb el budell prim. A més de diferències quantitatives, també difereixen els isotips d'IgA que produeixen (IgA-1 és més freqüent al budell prim, mentre que IgA-2 és predominant al còlon) [1].

Només hi ha dos estudis que hagin avaluat les diferències en les proporcions de subtipus de limfòcits T a la mucosa intestinal sana humana [21, 22]. El percentatge de limfòcits T ($CD3^+$) total no varia de manera significativa al llarg de tot el budell [22]. En canvi, la distribució de Tc ($CD3^+CD8^+$) i Th ($CD3^+CD4^+$) sí varia segons la regió. Els Tc ($CD3^+CD8^+$) són predominants a la mucosa gàstrica i a l'intestí la seva presència es va reduint en sentit distal, mentre que les cèl·lules Th ($CD3^+CD4^+$), minoritàries a estómac i duodè, són les predominants a l'intestí gros [22]. Pel que fa als subtipus de limfòcits efectors $CD3^+CD4^+$ no hi ha diferències rellevants en Th1 o Th2, els primers es mantenen en valors molt baixos al llarg de tot l'intestí mentre que els segons són quasi totalment absents a la mucosa sana [21]. En canvi, els fenotips reguladors Treg [21, 22]

o efectors Th17 i Th22 [21] predominen al còlon dret (especialment al cec, a on la diversitat bacteriana és màxima) en comparació amb l'ili terminal o el sigma.

Les diferències en el perfil de cèl·lules del sistema immunitari a la mucosa intestinal són degudes essencialment a tres factors: 1) diferències en el contingut de la llum intestinal, 2) diferències en el procés de diferenciació o maduració *in situ* i 3) diferències en la migració de cèl·lules de sang perifèrica (*homing*). El procés de *homing* està mediat per l'expressió de quimiocines, integrines i selectines a l'endoteli vascular i l'expressió dels seus respectius receptors a la superfície dels leucòcits. Malauradament, no es coneix amb certesa com funcionen i com es regulen aquests mecanismes a la mucosa intestinal sana [23] i la informació sobre les diferències entre diferents compartiments és escassa. Per exemple, la quimiocina CCL25 només s'expressa a intestí prim i afavoreix la captació de limfòcits T, mentre que la quimiocina CCR10 només s'expressa al còlon i indueix el reclutament de cèl·lules plasmàtiques [1]. Algunes malalties intestinals (com la MCrohn) s'han associat a un reclutament excessiu de limfòcits activats i de memòria a la mucosa intestinal i s'estan desenvolupant noves teràpies focalitzades a bloquejar aquesta migració [23]. Serà per tant imprescindible en els propers anys determinar com funcionen aquests mecanismes a cadascun dels compartiments d'interès.

MALALTIA INFLAMATÒRIA INTESTINAL

El terme Malaltia Inflammatory Intestinal (MII) engloba un conjunt de malalties cròniques d'etiologia desconeguda que afecten al tub digestiu, essent les dues entitats principals la Malaltia de Crohn (MCrohn) i la Colitis Ulcerosa (CU). El seu curs alterna períodes d'activitat (brot o recidiva) amb períodes d'inactivitat (remissió).

Es desconeix la causa de la malaltia. La teoria més acceptada actualment proposa que la MII es desenvolupa en individus amb una predisposició genètica que provoca un reconeixement anormal, per part del sistema immune innat, d'antígens presents a la llum intestinal. L'estímul antigènic no es coneix amb exactitud però és molt probable que sigui una microbiota alterada, que desencadena una resposta immune adaptativa exacerbada.

ASPECTES CLÍNICS

Malaltia de Crohn

La MCrohn pot acabar produint una afectació transmural de la paret del budell i pot afectar la totalitat del tracte gastrointestinal des de la boca fins l'anus. De forma característica afecta a zones discontinües del tracte digestiu donant lloc a l'aparició de complicacions locals com estenosis, fístules o abscessos. La complexitat de la malaltia ha obligat a definir patrons de comportament establerts a la classificació de Montreal i que tenen en compte l'edat al diagnòstic (A, *Age*), el comportament de la malaltia (B, *Behaviour*) i la localització (L, *Location*) (taula 1) [24]. Aquest patrons, que inclouen la malaltia amb patró inflamatori (no perforant, no estenosant), estenosant, penetrant o fistulitzant no són patrons estàtics si no que evolucionen al llarg dels anys. La major part de pacients en el moment del diagnòstic tenen un patró inflamatori i al cap dels

anys evolucionen cap a formes penetrants (més agressives) o estenosants (més indolents). Respecte a la localització, la major part de pacients tenen la malaltia localitzada al colon o a la regió ileocòlica. No obstant, amb la disponibilitat de tècniques més precises per a l'avaluació del budell prim com son la càpsula endoscòpica i la enterorressonància, cada cop es diagnostiquen més pacients que tenen una afectació exclusivament de tracte gastrointestinal superior (L4).

<p>Edat al diagnòstic (A):</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ A1: ≤16 anys ○ A2: 17 a 40 anys ○ A3: > 40 anys
<p>Patró clínic (B):</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ B1: Inflamatori ○ B2: Estenosant ○ B3: Fistulitzant <p>Si, a més, hi ha afectació perianal s'indica amb "p" (B1p; B2p; B3p)</p>
<p>Localització (L):</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ L1: Íleon terminal ○ L2: Còlon ○ L3: Ileo-còlica ○ L4: Tracte digestiu superior <p>A més, es poden presentar les següents combinacions: L1+L4; L2+L4; L3+L4</p>

Taula 1. Classificació de Montreal per a la Malaltia de Crohn [24]

Les manifestacions clíniques depenen molt de la localització i inclouen la presència de diarrea, febre, dolor abdominal de tipus obstructiu i emissió de sang i moc. La gradació de l'activitat de la MCrohn és també fonamental, tant a la pràctica clínica, com en estudis d'investigació. Els pacients amb malaltia lleu i moderada tenen poca afectació de l'estat general, el nombre de deposicions és poc abundant i els símptomes sistèmics poc predominants. La tolerància a l'alimentació oral és correcta i no hi ha símptomes de deshidratació. Per contra els pacients greus mostren una important pèrdua de pes, afectació de l'estat general, febre, anèmia i altres símptomes

relacionats amb la presència de complicacions locals com obstrucció (vòmits) o abscessos (massa inflamatòria i febre). La utilitat, avantatges i inconvenients dels diferents índexs d'activitat a la MCrohn s'ha revisat en profunditat [25]. Els índexs d'activitat de la malaltia tenen més precisió per a l'avaluació de la malaltia amb patró inflamatori. Això no obstant, recentment s'està posant molt més èmfasi en identificar precoçment l'existència de MCrohn incapacitant. És a dir de detectar aquells pacients que de manera precoç i irreversible presentaran un dany estructural permanent i que es podrien beneficiar de tractament immunosupressor combinat (immunomoduladors i biològics) precoç amb la màxima eficàcia terapèutica.

Colitis Ulcerosa

La CU afecta exclusivament al còlon i la inflamació es limita a la mucosa. Les manifestacions clíniques són variables en funció de la gravetat de la malaltia, essent els símptomes clàssics diarrea, rectorràgia, dolor abdominal, anorèxia i febre. Segons la localització es classifica en:

- Proctitis: inflamació limitada al recte
- Colitis esquerra: Afectació fins a angle esplènic
- Colitis extensa: afectació fins més enllà de l'angle hepàtic del còlon.

Diagnòstic diferencial. Colitis indeterminada

El diagnòstic diferencial entre CU i MCrohn en general no ofereix dubtes. A la taula 2 es descriuen les característiques diferencials més rellevants. No obstant, hi ha un grup de pacients, que representen menys d'un 10%, que tenen la malaltia localitzada al còlon en els que no és possible el diagnòstic diferencial entre CU i MCrohn. El terme de colitis indeterminada serveix per a definir aquests pacients, que presenten generalment una malaltia molt greu, extensa i que requereix l'extirpació del còlon (colectomia) en un percentatge elevat de casos per al control de la malaltia.

CARACTERÍSTIQUES CLÍNiques	Colitis Ulcerosa	Malaltia de Crohn
Rectorràgia	Freqüent	Poc freqüent
Emissió de moc o pus	Freqüent	Poc freqüent
Afectació de budell prim	Mai	Molt freqüent
Obstrucció intestinal	Excepcional	Freqüent
Massa abdominal inflamatòria	Excepcional	Freqüent
Manifestacions extraintestinals (artritis, uveïtis, etc..)	Freqüent	Freqüent
Fístules i malaltia perianal	Poc freqüent	Freqüent
CARACTERÍSTIQUES ENDOSCÒPIQUES		
Úlceres Superficials	Freqüent	Poc freqüent
Úlceres Profundes	Poc freqüent	Freqüent
Afectació contínua i difusa	Freqüent	Poc freqüent
Afectació del recte	Freqüent	Poc freqüent
CARACTERÍSTIQUES HISTOLÒGIQUES		
Inflamació transmural	No	Si
Distorsió arquitectura de les criptes	Freqüent	Poc freqüent
Criptitis i abscessos de criptes	Més freqüent	Menys freqüent
Granulomes	Mai	Poc freqüent (30%)
Fissures	Rarament	Molt freqüent

Taula 2. Característiques clíniques de la MC i la CU. Taula cedida per Dra. Maria Esteve.

A la figura 4 es mostren les característiques macroscòpiques i microscòpiques de la MII segons la localització.

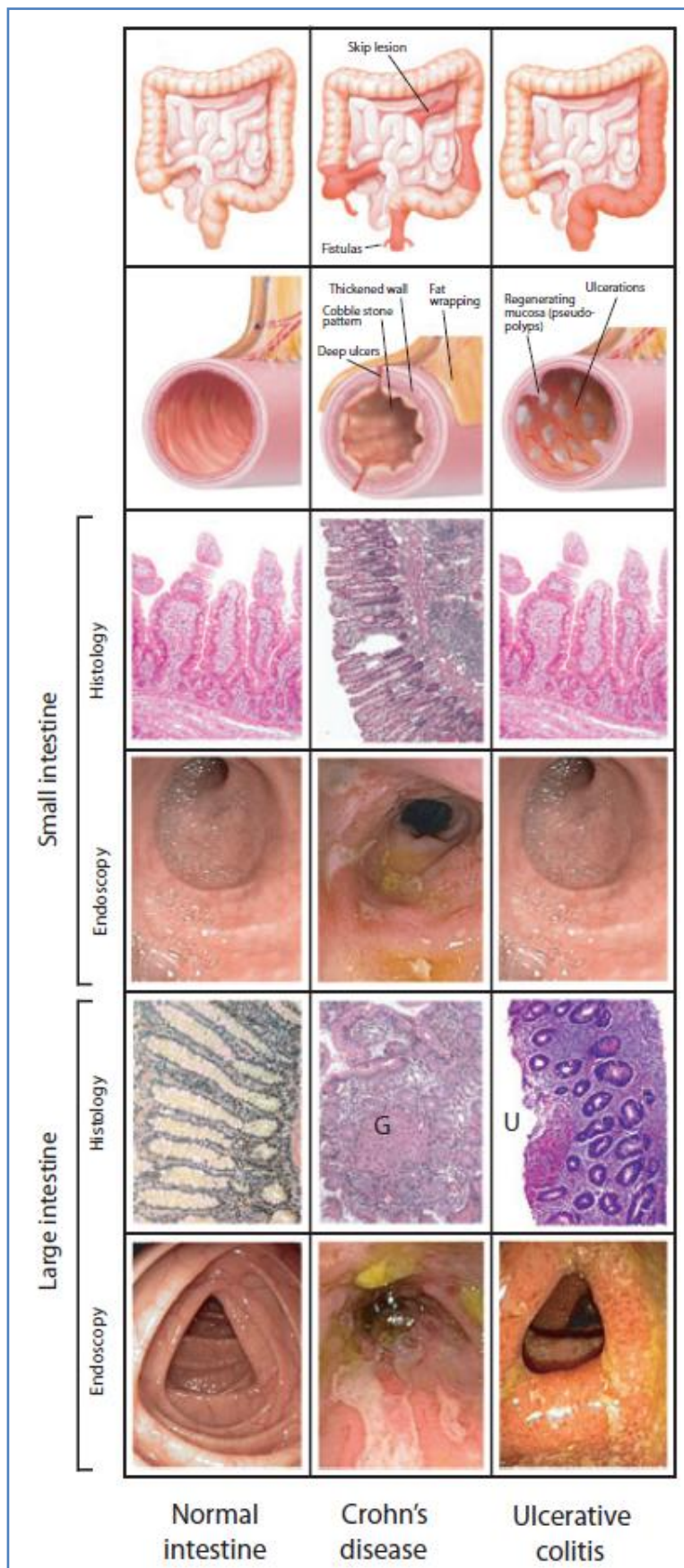


Figura 4. Característiques microscòpiques i macroscòpiques de la MII. Reimprès amb permís de Wiley Company, extret de Marsal, J i Agace, WW, The Journal of Internal Medicine, 2012 [23]. G, granuloma; U, úlcera

Les biòpsies de pacients amb CU poden mostrar un infiltrat inflamatori crònic a LP, en forma d'un augment del nombre de cèl·lules plasmàtiques i neutròfils, distorsió de l'arquitectura de les criptes i abscessos de criptes. En general a la CU només hi ha una afectació de la mucosa o eventualment de les capes més superficials de la submucosa, sense afectar les capes més profundes del budell. En canvi, a la MCrohn el procés inflamatori és generalment transmural. Les biòpsies de MCrohn poden mostrar agregats limfoides, fibrosi, hiperplàsia de criptes o granulomes. A nivell estructural, la MCrohn pot produir un engruiximent de la paret i una proliferació anòmala de teixit fibrós i adipós a la serosa, que pot provocar el que s'anomena "embolcall de greix" (*fat wrapping o creeping fat*)[23].

TRACTAMENT

L'elecció del tractament dependrà fonamentalment de l'activitat i la localització. A la MCrohn també es té molt en compte el patró de comportament. La majoria dels fàrmacs són útils tant a CU com a MCrohn. Hi ha guies de consens recentment publicades on es troba de manera detallada el tractament recomanat en base a la millor evidència disponible en les diferents situacions clíniques. Al nostre medi es segueixen en general les guies de la Societat Europea de Malaltia de Crohn i Colitis Ulcerosa (ECCO)[26, 27].

Tractament de la MCrohn

S'han proposat diverses estratègies terapèutiques. La primera d'aquestes és "l'estratègia convencional" amb una escalada terapèutica pas a pas començant pel tractament amb esteroides. Si la resposta no és adequada, per corticorefractarietat o corticodependència, s'administren immunomoduladors (generalment tiopurínics o metotrexate) i si aquests no són suficients per a mantenir la MCrohn sota control s'administren fàrmacs anti-TNF. Recentment (setembre 2015), s'ha incorporat vedolizumab (anticòs monoclonal anti Integrina $\alpha 4$) a l'esquema terapèutic [28]. El seu ús, de moment, es reserva a pacients amb malaltia refractària a immunomoduladors o anti-TNF.

A la figura 5 es mostra l'esquema terapèutic general dels pacients amb MCrohn segons una estratègia "step care" convencional. El consens d'ECCO 2010 respecte al tractament del patró inflamatori segueix essent essencialment el mateix que al 2006.

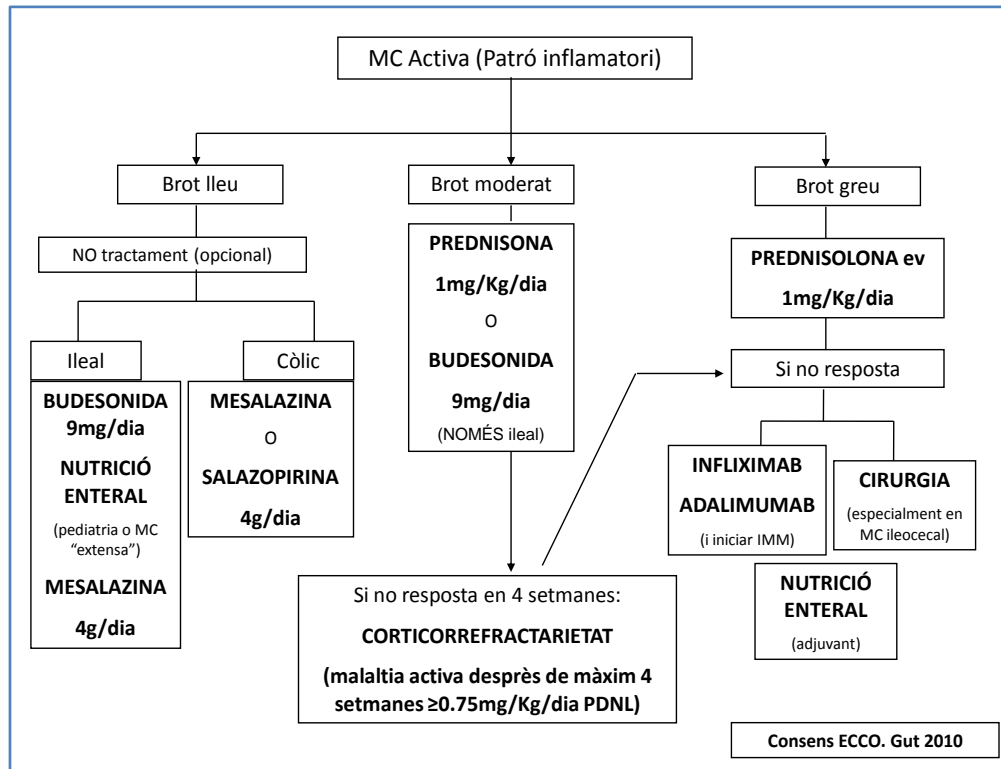


Figura 5. Tractament de la MCrohn amb patró inflamatori (step care convencional).

(PDNL, prednisolona; IMM, immunomoduladors)

En una estratègia de tractament convencional l'elecció del tractament vindrà determinada fonamentalment per l'activitat, la localització i en el cas de la MCrohn també pel patró de comportament. En una estratègia "step-care" convencional els corticoides segueixen sent els fàrmacs de primera elecció per als brots moderats i greus. La resposta als esteroides té també implicacions pronòstiques, de tal forma que els pacients que presenten una bona resposta perllongada (corticosenibles) tenen una forma menys agressiva de la malaltia i, en general, fàcilment controlable. En canvi els pacients amb corticopendència o refractarietat acostumen a tenir una malaltia de difícil control amb necessitat d'administració d'immunosupressors i fàrmacs biològics. Aquests últims s'han introduït a la pràctica clínica a l'última dècada i tenen una acció

antiinflamatòria molt més selectiva. El descobriment de la seva eficàcia clínica ha estat el resultat del coneixement dels mecanismes fisiopatològics bàsics que condueixen a l'aparició o perpetuació de la inflamació intestinal. Dins del terme de teràpies biològiques s'engloben una sèrie d'actuacions terapèutiques que consisteixen en l'administració o bloqueig de determinades molècules del propi organisme, considerades clau en la resposta immunològica, com per exemple determinades citocines. En aquest sentit, els anticossos anti-TNF en són l'exemple més paradigmàtic, però també hi ha una certa experiència en el bloqueig de molècules d'adhesió o en l'administració de citoquines antiinflamatòries com la IL-10 [29].

La "estratègia accelerada" comporta donar immunomoduladors a tots els pacients des del moment del diagnòstic tinguin o no criteris de malaltia agressiva. Hi ha relativament pocs estudis que hagin avaluat l'ús precoç de fàrmacs immunomoduladors i biològics. En un estudi controlat amb placebo realitzat en un nombre limitat de nens (n=52), el tractament amb 6-mercaptopurina dins les primeres 8 setmanes del diagnòstic va demostrar que era capaç de reduir el nombre de recaigudes i la necessitat d'esteroides durant un seguiment de 18 mesos [30]. Dos estudis realitzats en població adulta, els estudis AZTEC [31] i RAPID [32] recentment publicats han avaluat l'eficàcia de l'ús precoç d'azatioprina, menys de 8 setmanes del diagnòstic a l'AZTEC i menys de 6 mesos al RAPID. A diferència de l'estudi realitzat en edat pediàtrica, cap dels 2 estudis va trobar diferències en el percentatge de remissió sostinguda lliure d'esteroides entre azatioprina i placebo (18 mesos de seguiment a l'AZTEC o 3 anys al RAPID). Per tant, es podria dir que aquesta pauta de tractament accelerat amb immunomoduladors no és útil administrat de manera precoç. És probable, de tota manera, que la manca d'eficàcia i de l'absència de diferències entre grups de tractament s'hagi degut a que l'azatioprina es va donar a pacients que segurament no la necessitaven (malaltia d'evolució benigna) i que haurien anat bé sense més tractament que els esteroides d'inducció. En canvi alguns d'aquests pacients van presentar efectes adversos per un tractament innecessari, el que va obligar a la seva retirada.

L'anomenada estratègia "*top-down*" propugna l'ús precoç de fàrmacs anti-TNF amb la intenció d'aconseguir no només una major eficàcia immediata, si no també

amb la intenció de modificar la història natural de la malaltia. També aquí i malgrat que s'han escrit múltiples revisions sobre el tema i que existeix un corrent d'opinió que li dona suport, les evidències disponibles són escasses. Diversos estudis han demostrat que el tractament precoç combinat (COMBO) amb immunosupresors i biològics és més eficaç que l'administració de qualsevol d'ells per separat, amb una toxicitat a curt termini (1 any) assumible. L'estudi Sonic que va incloure 508 pacients amb MC, diagnosticats en els 2 anys previs a la inclusió va demostrar clarament que la combinació azatioprina més infliximab es més eficaç per a induir i mantenir la remissió durant un any de tractament. I les diferències obtingudes van ser significativament superiors a la monoteràpia amb azatioprina o infliximab. Per tant, queda clar que el tractament combinat és el més eficaç [33]. En canvi, la informació disponible sobre la capacitat que té un tractament intensiu precoç de modificar la historia natural de la MC és molt limitada. Un sol estudi ha comparat la eficàcia i seguretat de l'estratègia "top-down" vs "step-up" i va demostrar que als 2 anys de tractament un percentatge significativament superior de pacients del grup "top-down" va tenir curació mucosa en comparació amb el grup de la estratègia "step-up". D'altra banda durant un seguiment de 2 anys més es va demostrar que els pacients de la estrategia "top-down" desenvolupaven menys malaltia perianal i sobre tot que van tenir menys requeriments de fàrmacs biològics suggerint que un tractament intensiu a l'inici de la MC podria modificar la història natural [34]. Malgrat que han passat més de 5 anys des de la publicació de l'estudi inicial i més de 3 des de l'estudi d'extensió, no disposem d'informació sobre el seguiment a llarg termini d'aquests pacients el que permetria determinar si efectivament tots els pacients es beneficien o no d'un tractament combinat intensiu precoç.

Tractament de la CU

L'elecció del tractament d'elecció en els brots de CU dependrà sobretot de l'extensió del segment de còlon afecte i del grau d'activitat de la malaltia. Al nostre centre s'empra la classificació de Montreal i l'índex de Truelove i Witts [24] per a determinar el grau d'activitat de la malaltia.

Per als brots de proctitis (fins a 20 cm del marge anal), el tractament d'elecció són aminosalicilats (5-ASA) administrats per via rectal a dosi mínima d'1g/dia. Davant la manca de resposta, convé augmentar-ne la dosi o combinar-ho amb esteroides d'aplicació també local. El tractament amb esteroides per via oral o parenteral ha de ser l'últim recurs davant un fracàs de tractament.

Per als brots lleus o moderats de CU distal o extensa, el tractament d'elecció és el 5-ASA combinat (oral i tòpic alhora) a una dosi mínima de 3g/dia (oral). Davant la manca de resposta, es tractarà com si fos un brot greu.

Per als brots moderats o greus de CU distal o extensa, el tractament d'elecció són els esteroides sistèmics, a dosi d'1mg/Kg/dia, d'administració per via oral (brots moderats) o per via endovenosa (brots greus o moderats que no han presentat una bona resposta a la via oral). Si la resposta clínica és favorable, es continua el tractament fins a completar 14 dies (via oral) o 7 dies (via endovenosa) per a posteriorment seguir una pauta descendent fins a la retirada completa dels esteroides. Malauradament, fins a un 50% dels pacients no responen o tenen una resposta clínica insuficient. En casos de CU activa refractària a esteroides, es pot emprar com a tractament de rescat tant fàrmacs biològics (influximab [35]) com immunosupressors (ciclosporina[36]). L'eficàcia i el percentatge d'efectes adversos de tots dos són similars [37], i davant d'un fracàs de la primera opció es pot intentar tractament de rescat amb la segona (ciclosporina davant d'un fracàs d'influximab o *viceversa*). Vedolizumab pot ser útil per al tractament de pacients amb CU moderada-greu activa sense resposta a immunomoduladors i biològics [38], i és especialment interessant per a pacients amb resistència o intolerància a anti-TNFs, ja que ofereix una via terapèutica alternativa. Davant un fracàs al tractament de rescat, s'indica colectomia.

FISIOPATOLOGIA

La fisiopatologia de la MII és extremadament complexa i basada en la intricada interacció de 4 components bàsics: el *background* genètic, la microbiota, el sistema immunitari i l'ambient (dieta, tabac, etc) que modula i modifica als altres [39]. Tradicionalment la MCrohn i la CU s'han estudiat de manera conjunta, però avui en dia està molt clar que constitueixen dues entitats fisiopatològiques completament diferents. Aquesta tesi es basa en l'estudi del paper fisiopatològic d'alguns subtipus de limfòcits T, que representen només una petita part de les alteracions descrites en el sistema immunitari a la MII, que és al seu torn només un dels 4 components implicats a la MII (figura 6).

Malgrat que la quantitat d'estudis sobre les alteracions del sistema immunitari de la MII és aclaparadora, la nostra comprensió global és encara molt limitada. Això és degut en part a que encara no sabem amb certesa quins fenòmens són primaris i quins secundaris, ni quina és la seva seqüència temporal, ni com es veuen modificats per la resta de components genètics i ambientals [39]. Una comprensió global de la fisiopatologia de la MII només es podrà assolir quan siguem capaços d'integrar de manera conjunta tots aquests components i com interaccionen entre si. En aquest sentit, els estudis "-òmics", la biologia de sistemes i el desenvolupament de noves eines d'intel·ligència artificial que permetin processar aquesta quantitat ingent d'informació és l'únic camí possible per a arribar a una comprensió real dels fenòmens que tenen lloc en aquesta malaltia i eventualment podrien obrir pas a una nova era de medicina personalitzada adaptada a les característiques úniques de cada pacient.

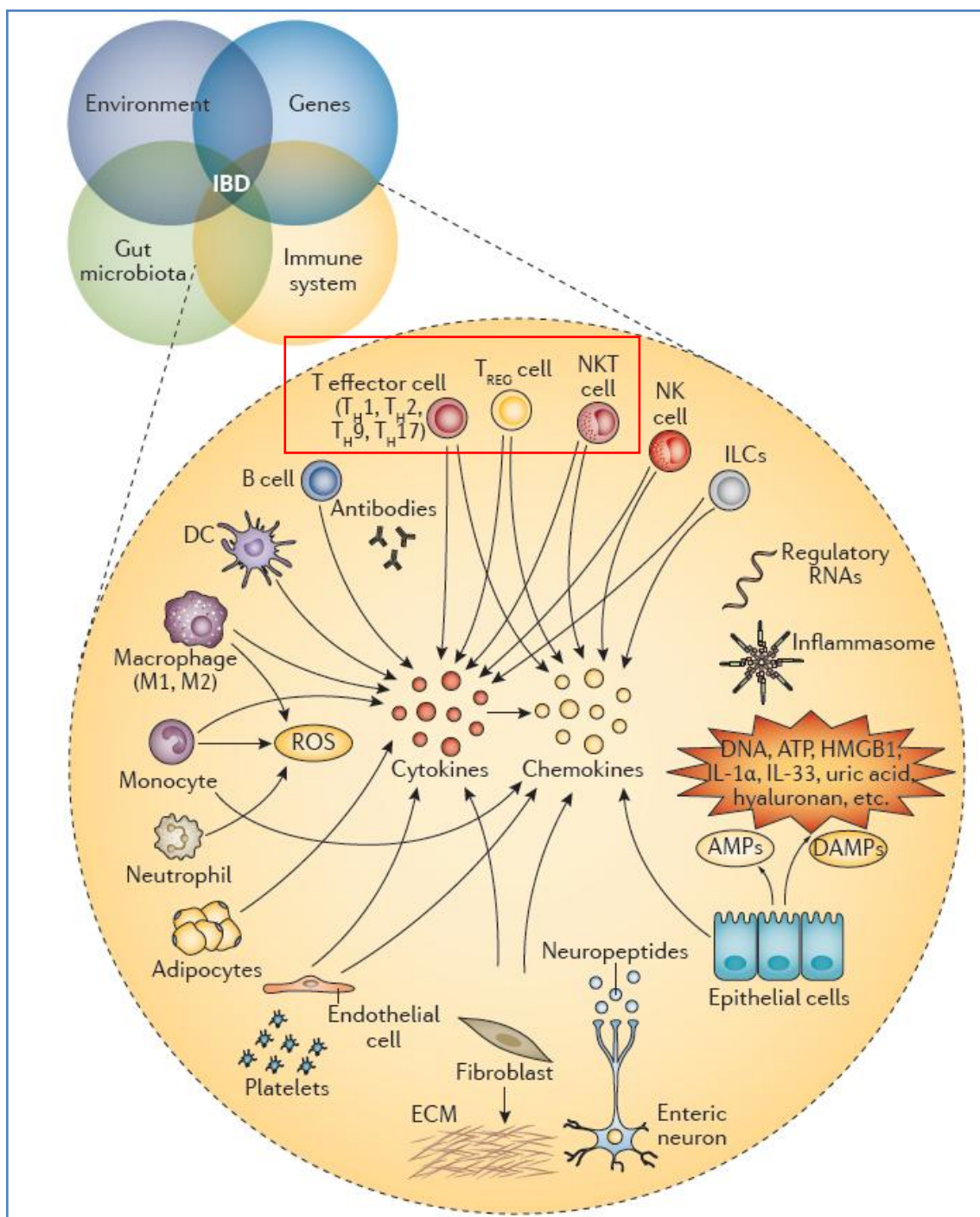


Figura 6. Factors immunitaris i no immunitaris implicats en la fisiopatologia de la MII. Reimprès amb permís de Macmillan Publishers LTD: de Souza i Fiocchi, Nature Reviews in Gastroenterology and Hepatology (copyright 2016)

Genètica

Els factors genètics tenen un paper important tant en la susceptibilitat a desenvolupar la malaltia com en l'evolució del seu curs clínic. La importància de la genètica en la fisiopatologia de la MII es demostra amb múltiples evidències que procedeixen d'estudis epidemiològics clàssics:

- S'han descrit diferències ètniques en la incidència i la prevalença de la MII [40], essent superior en caucàsics i especialment en jueus *Ashkenazi* [41].
- S'ha confirmat mitjançant múltiples estudis d'agregació familiar que el risc de patir la malaltia és superior tenint familiars afectats [42].
- Estudis en bessons demostren una major concordança en la aparició i en les característiques de la MII entre bessons homozigòtics comparats amb bessons dizigòtics [42].

L'any 2001 es va descriure el primer gen associat a susceptibilitat a la MCrohn, el *NOD2/CARD15*, que codifica un receptor intracel·lular que participa en el reconeixement de peptidglicà bacterià i s'expressa a monòcits, macròfags, cèl·lules dendrítiques i cèl·lules de Paneth. Es coneixen 30 polimorfismes no conservadors del gen que es relacionen amb la MCrohn (i no amb la CU), però només les 3 variants més comunes (*Arg702Trp*, *Gly908Arg*, *Leuc100insC*) representen el 82 % dels al·lels mutats. Les mutacions de *NOD2* s'associen amb una menor expressió de pèptids antimicrobians i α -defensines. Diversos estudis han mostrat un efecte gen-dosi (major risc en homozigots vs heterozigots). El 35-45% de pacients caucàsics de MCrohn són portadors d'alguna variant de *NOD2*, mentre que són pràcticament inexistents en poblacions asiàtiques i afroamericanes.

En els últims anys, i gràcies als estudis d'associació (GWAs) el nombre de gens associats a la MII ha crescut de manera exponencial. Un recent metanàlisi de múltiples GWAs realitzats amb mostres de pacients de MII, i que inclou més de 75.000 casos i controls, ha ampliat la llista de loci confirmats fins a 163, dels quals 110 són comuns per a MCrohn i CU, mentre que 23 s'associen només a CU i 30 només a MCrohn [43]. El

70% d'aquests loci s'associen també a altres malalties immunitàries com la diabetis tipus 1, la psoriasi i la espondilitis anquilosant.

Factors reguladors de l'expressió gènica: epigenètica i miRNAs

L'epigenètica es defineix com els canvis heretables en l'expressió del genoma sense alteració de la seqüència de DNA. Els mecanismes principals afecten el grau "d'empaquetament" del DNA mitjançant canvis en la metilació, modificació d'histones i posicionament dels nucleosomes. Les alteracions epigenètiques reflecteixen l'efecte de l'ambient sobre el genoma i podrien explicar la "heretabilitat" de la MII no atribuïble als canvis en el genoma[44].

Els microRNA (miRNA) són RNAs no codificants de cadena curta (18 a 24 nucleòtids) que actuen com a reguladors post-transcripcionals de l'expressió gènica. Es creu que regulen més del 60% de la totalitat de mRNAs codificants de l'organisme. Múltiples estudis recents suggereixen que poden ser de gran importància en la fisiopatologia de la MII i que podrien ser útils com a biomarcadors i com a possibles dianes terapèutiques [44].

Microbiota

La microbiota té una gran importància en múltiples malalties, no només digestives, ja que s'han descrit alteracions en malalties tan diverses com l'asma i inclús l'autisme. Es defineix disbiosi com una alteració o canvi en la composició de la microbiota en comparació amb el que es troba a la mucosa del budell sa, i que es pot manifestar amb tres característiques, totes tres presents i descrites a la MII:

1) pèrdua de microorganismes beneficiosos [45].

2) expansió de patobionts, o microorganismes que habitualment estan presents en quantitats molt baixes en una mucosa d'un budell sa, però que tenen la capacitat de danyar a l'hoste si el seu número s'incrementa (per exemple, *E. Coli*, *Shigella* o *Klebsiella*) [45].

i 3) pèrdua de la biodiversitat bacteriana global [46].

En general es considera que la MCrohn presenta un augment de l'abundància de Bacteroidetes o Proteobacteria juntament amb una reducció de Firmicutes [47]. La microbiota de la MCrohn pot alterar el curs clínic de la malaltia, per exemple, la reducció de *Fecalibacterium prausnitzii* s'associa a un increment del risc de recurrència post-quirúrgica[48]. Les alteracions característiques de la microbiota a la CU són menys conegudes.

Quan es parla de microbiota, generalment només es pensa en les comunitats de bacteris, però no hem d'oblidar que hi ha altres microorganismes presents a la llum intestinal. En aquest sentit, hi ha certa evidència de la influència del viroma (virus, especialment bacteriòfags) [49] i de la "micobiota" (fongs) [50] a la MII.

Sistema immunitari innat

La MII es relaciona amb una mala comunicació entre la microbiota i el sistema immunitari innat, juntament amb defectes en la funció barrera de l'epiteli.

La MCrohn es relaciona amb defectes en l'autofàgia, procés que té molta importància en el correcte processament d'antígens, i amb una expressió anormal de pèptids antibacterians [39]. En concret, la MCrohn ileal manifesta una reducció en les α -defensines HD5 i HD6 [51] i una expressió gènica de diferents mucines (components del moc intestinal) reduïda [52, 53]. A la MCrohn de còlon es detecta una reducció de les β -defensines HBD2, HBD3 i HBD4[54].

A la CU, la capa de moc interna (*inner layer*), que hauria de ser estèril i impermeable, presenta porus que permeten als bacteris arribar al contacte directe amb l'epiteli[55].

Sistema immunitari adaptatiu

Clàssicament s'ha considerat la MCrohn com una malaltia de tipus Th1 (per l'augment de producció d'IFN- γ i IL-12) i la CU com una malaltia de tipus Th2 "atípic" (per la presència de IL-5 i IL-13, però no de IL-4). Aquest paradigma ha canviat gràcies a la recent descoberta de nous subtipus cel·lulars, com les Th17 i les Treg i a la milloria de les tècniques de detecció (sobretot els avenços en citometria de flux

multiparamètrica) que permet descobrir nous fenotips i caracteritzar-los amb més precisió.

El patró de citocines "Th2 atípic" present a la CU actualment s'atribueix a dos tipus cel·lulars: limfòcits Th9, productors d'IL-9 [56] i a un subtipus de limfòcit NK-T poc convencional, productor de IL-13 [57].

- **Cèl·lules Th1 i Th17**

Tant la MCrohn com la CU s'associen actualment a un excés de cèl·lules Th17 a la mucosa, juntament amb un increment de l'expressió de les citocines que secreten [58, 59]. Moltes de les funcions proinflamatòries prèviament atribuïdes a Th1 o Th2 són realment causades per aquesta resposta Th17 exacerbada característica de la MII [60]. Les cèl·lules Th17 a la CU i la MCrohn són diferents, essent les últimes més "patològiques", amb major producció de citocines proinflamatòries (especialment IL-21) i amb capacitat d'induir una resposta Th1, que no es detecta a la CU [61]. S'han detectat a la MCrohn, i no a la CU, cèl·lules coproductores d'IL-17-A i IFN- γ [58]. De fet la MCrohn actualment es considera una malaltia de tipus Th1/Th17, en la que l'equilibri d'aquests dos subtipus cel·lulars no és estàtic, sinó que varia amb la cronificació i la gravetat de la malaltia, amb major predomini de Th17 a l'inici de la inflamació i un predomini de Th1 amb la cronificació [62] o l'agreujament de la malaltia [63].

- **Cèl·lules Treg**

La mucosa inflamada de pacients amb MCrohn o CU activa mostra a la majoria d'estudis valors incrementats de mRNA de FOXP3 i de cèl·lules Treg mesurades per immunohistoquímica, tant en mostres de peça quirúrgica [64] com en biòpsies intestinals endoscòpiques [65-67] en comparació amb controls sans. A més, s'ha demostrat que l'expressió de FOXP3 està encara més incrementada a la mucosa intestinal de pacients pediàtrics amb MCrohn i particularment a la mucosa ileal en comparació amb pacients adults amb MCrohn [68]. No s'observen en canvi diferències en els valors de les Treg en funció de la gravetat de la malaltia. Aquestes diferències

relacionades amb l'edat i amb la localització intestinal, no s'observen als individus control [68].

En contrast amb els resultat descrits de Treg a la mucosa intestinal, els valors de Treg es troben significativament reduïts en sang perifèrica respecte dels controls sans [67, 69]. S'ha descrit que aquesta disminució de Treg, detectada en fase d'activitat retorna a valors normals durant els períodes de remissió [65]. De fet s'ha suggerit que aquesta població cel·lular, essencial per a induir fenòmens de tolerància, mostraria una contracció a la sang perifèrica i una expansió a la mucosa intestinal més o menys marcada, però generalment considerada insuficient durant els brots d'activitat. El significat fisiopatològic d'aquest subtipus cel·lular encara s'està definint, però se sap que expressen tant marcadors de receptors TCR, com receptors toll-like (TLR) i que permeten la interacció amb antígens peptídics o bacterians respectivament.

S'ha descrit a la mucosa de MCrohn, però no a la CU, ni als controls, la presència d'un nou subtipus cel·lular de Treg, que produeix IFN γ i IL-17, i que comparteix característiques fenotípiques i funcionals d'ambdós subtipus cel·lulars (Treg/Th17). Aquest nou tipus cel·lular que no s'ha detectat *in vivo* en pacients amb CU, es pot induir *in vitro* mitjançant cultiu amb TGF- β [70]. De fet aquesta plasticitat en les vies de diferenciació de cèl·lules Treg i Th17 depèn de l'entorn inflamatori, de tal manera que en presència de determinats mediadors de la inflamació com TGF- β , es pot produir una diferenciació cap a cèl·lules productores de citocines proinflamatòries (IL-17), contribuint per tant a la patogènesi de la malaltia.

- **Apoptosi de limfòcits T**

La mort cel·lular per apoptosi constitueix un mecanisme d'aclariment de limfòcits activats de la mucosa intestinal sana per tal d'evitar una resposta excessiva o perllongada. Els nivells d'apoptosi de limfòcits de LP de mucosa sana és molt superior al que tenen les cèl·lules de sang perifèrica, tant de manera espontània com després de l'estimulació *in vitro* [71], en un procés mediat per la via Fas/Fas-Lligand. Estudis realitzats a finals dels anys 90 suggerien que la MCrohn presenta una resistència a la apoptosi de limfòcits T [72] que contribuiria a l'acumulació de cèl·lules a la LP i la conseqüent perpetuació i cronificació de la MCrohn. Aquesta resistència a l'apoptosi

s'ha relacionat amb una ratio anormal de proteïnes pro i antiapoptòtiques (Bax i Bcl, respectivament)[73] i amb un excés de survivina (proteïna antiapoptòtica) [74]. De fet, s'ha arribat a considerar que la inducció de l'apoptosi de limfòcits T és essencial per a l'eficàcia terapèutica dels fàrmacs immunosupressors [75] i dels fàrmacs anti-TNF, com infliximab [76] i adalimumab [77]. De la mateixa manera, la manca d'eficàcia d'altres anti-TNF, com etarnecept, s'ha atribuït a la seva incapacitat d'inducció de l'apoptosi [78]. Per contra, existeixen altres anti-TNF (certolizumab pegol) que no indueixen l'apoptosi i si mostren eficàcia terapèutica [79].

Tot i això, diversos estudis d'altres grups demostren que aquesta resistència a l'apoptosi no és única de la MCrohn sinó que es dona en qualsevol altra forma d'inflamació intestinal, independent del tipus de malaltia, incloent CU [80, 81] i colitis isquèmica i infecciosa [80]. Per tant, sembla que la manca d'apoptosi de limfòcits és una característica pròpia i inespecífica del teixit inflammat més que no pas un tret característic de la MCrohn. En aquest sentit, un estudi del 2004 que compara el percentatge d'apoptosi de mostres de budell sanes i inflamades de MCrohn i CU demostra que la reducció de l'apoptosi es limita a zones inflamades, mentre que les zones no afectades es comporten exactament igual que els controls sans [82].

Un estudi previ del nostre grup també demostra que la resistència a la apoptosi de limfòcits T no és un tret primari de la MCrohn sinó que es presenta només en pacients amb mala resposta a esteroides (corticodependents i corticorrefractoris) després de 15 dies de tractament, però no a la mostra basal (pre-tractament). Això suggereix que no és una alteració primària de la MCrohn. A més també es demostra que no es un tret únic dels limfòcits T sinó que aquest fenomen també es dona, i de manera més exagerada i en fases més inicials, als limfòcits B [83]. En aquesta mateixa línia, altres estudis suggereixen que la mesura de la inducció de la apoptosi per fàrmacs anti-TNF pot ser útil per a predir la resposta al tractament, amb valors de mort cel·lular inferiors en pacients amb mala resposta en comparació amb pacients responedors [84-86].

Malgrat totes aquestes evidències en contra d'un defecte intrínsec en l'apoptosi a la MCrohn, en una excel·lent revisió publicada recentment (gener 2016) a

la revista Nature Reviews in Gastroenterology and Hepatology, Fiocchi i de Souza encara insisteixen que les cèl·lules T de la MCrohn són resistents a la apoptosi [39].

COLITIS MICROSCÒPICA

La colitis microscòpica (CM) és una malaltia intestinal que cursa amb diarrea crònica aquosa sense sang i en la que l'aspecte endoscòpic és normal o quasi normal. Inclou dues patologies: la colitis col·làgena (CC), descrita per primer cop per Lindström l'any 1976 [87] i la colitis limfocítica (CL), descrita als anys 80 per Read [88] i posteriorment Lazenby [89]. La seva etiologia és desconeguda, i probablement implica una resposta immunitària a algun factor de la llum intestinal en individus genèticament predisposats. La CM afecta sobretot a dones de més de 65 anys, però s'han descrit casos en tots els grups d'edat, incloent població pediàtrica[90, 91].

ASPECTES CLÍNICS

El símptoma principal de la malaltia és la diarrea aquosa sense sang. Alguns pacients poden presentar dolor abdominal, incontinença fecal o diarrea nocturna [92]. Hjorstwang i col·laboradors van definir els criteris de remissió i activitat clínica segons l'efecte de la diarrea sobre la qualitat de vida (Taula 2) [93]. Aquesta malaltia no acostuma a presentar complicacions greus, tanmateix s'han reportat casos puntuals de deshidratació i insuficiència renal, perforació del còlon secundària a un augment de la fragilitat de la mucosa del còlon [92] i un cas d'amiloidosi secundària[94]. El curs de la CM és en general benigne [95], i a diferència de la MII, els pacients no presenten un risc de càncer de còlon superior a la població general, ans al contrari el risc de presentar adenomes de còlon és inferior al de la població general [96].

	Deposicions/dia (*)		Deposicions aquoses/dia (*)
Remissió clínica	<3	i/o	<1
Activitat clínica	≥3	i/o	≥1
(*) Mitjana d'una setmana de registre			

Taula 3. Hjorstwang-Criteria: Definició d'activitat clínica per a la CC [92]

FACTORS DE RISC I MALALTIES ASSOCIADES

El factors de risc associats a la CM són el sexe femení i l'edat avançada, el tabaquisme, la ingesta de fàrmacs i la presència de malalties autoimmunes associades [97].

Tabaquisme

S'ha demostrat repetidament que el tabaquisme és un factor de risc per al desenvolupament de CM [98-100]. Els pacients amb CC fumadors debuten una dècada abans que els no fumadors [99, 101], i tenen una menor probabilitat d'assolir la remissió clínica [102].

Ingesta de fàrmacs

Alguns fàrmacs podrien actuar com a agents desencadenants o agreujants de la malaltia. El consum d'inhibidors de la bomba de protons, antiinflamatoris no esteroidals, inhibidors selectius de la recaptació de la serotonina, betabloquejants o estatines, entre d'altres, han demostrat ser factors de risc per a la CM [92, 98, 103].

Malabsorció d'àcids biliars

És freqüent la presència concomitant de diarrea per malabsorció d'àcids biliars, essent la freqüència lleugerament superior a la CC (41%, IC 95% 37-45) en vers la CL (29%, IC 95% 24-34)[104]. El tractament amb colestiramina és efectiu en aquests casos [95, 105].

Malalties autoimmunitàries

La CM s'associa de manera independent amb múltiples malalties autoimmunes, com la malaltia celíaca, patologia tiroïdal, diabetis mellitus tipus I o artritis reumatoide. La distribució és similar a CC i CL [104].

CRITERIS PER AL DIAGNÒSTIC HISTOLÒGIC

Cal prendre biòpsies esglaonades de tot el còlon, ja que en alguns casos les alteracions poden no ser uniformes al llarg de tot el còlon, essent les biòpsies de cec i còlon dret les que presenten la major rendibilitat diagnòstica [106-108].

Troballes comunes a CC i CL

- Infiltrat inflamatori a la LP, format per limfòcits, cèl·lules plasmàtiques, macròfags, neutròfils i eosinòfils
- Absència d'abscessos críptics. Sense distorsió de l'arquitectura glandular
- Lesió de l'epiteli, amb pèrdua de la polaritat dels nuclis, aplanament de les cèl·lules i vacuolització citoplasmàtica. Es pot arribar a desprendre totalment l'epiteli.
- Augment del nombre de LIEs (≥ 7 LIEs per cada 100 cèl·lules epitelials)

Criteris específics per al diagnòstic de CC

- Presència d'una banda de col·lagen subepitelial, de gruix $\geq 10 \mu\text{m}$. Malgrat és observable amb tinció hematoxilina&eosina, és recomanable realitzar tincions específiques (per exemple tricròmic) per a facilitar la seva visualització. En casos dubtosos, la tinció de tenascina pot ser útil per al diagnòstic diferencial i permet observar la banda subepitelial amb major claredat [109]. La banda tendeix a ser més prima al còlon distal, especialment a sigma i recte [108].

Criteris específics per al diagnòstic de CL

- Absència de banda de col·lagen subepitelial de gruix $\geq 10 \mu\text{m}$ (pot haver un cert engruiximent de la banda (de 5 a $10 \mu\text{m}$))
- Augment del nombre de LIEs (≥ 20 LIEs per cada 100 cèl·lules epitelials)

No hi ha cap correlació ni amb el gruix de la banda col·làgena a la CC ni en el nombre de LIEs a la CL amb la activitat clínica [110]. En canvi, si hi ha relació amb el grau d'inflamació de la LP, suggerint que la diarrea és d'origen inflamatori i mitjançada per mecanismes osmòtics i secretors [92].

TRACTAMENT

A la figura 7 es resumeix l'estratègia terapèutica actual. L'elecció del tractament dependrà de la gravetat de la simptomatologia i pretén assolir i mantenir la remissió clínica. Es desconeix si la remissió histològica és rellevant o no i actualment no és necessari repetir l'endoscòpia per a avaluar si hi ha curació mucosa o no [92]. L'únic fàrmac que ha estat avaluat a estudis controlats és la budesonida, i és el tractament d'elecció en pacients amb malaltia activa [111]. Només en pacients amb clínica molt lleu es pot considerar l'ús d'antidiarreics (loperamida), encara que no hi hagi evidència de la seva utilitat. En pacients amb malaltia greu i refractària a budesonida, es pot considerar l'ús de fàrmacs biològics [94, 112] o immunosupressors [113]. Davant un fracàs a tots els tractaments i una clínica greu, la última elecció és la cirurgia (ileostomia o colectomia)[114-116].

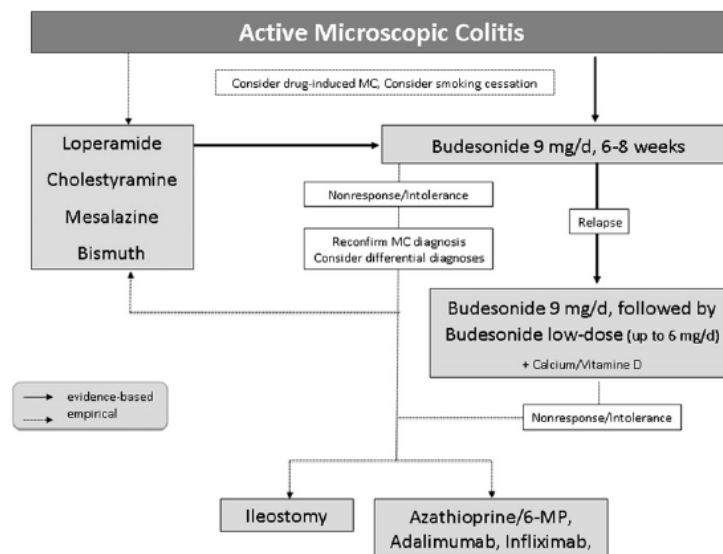


Figura 7. Algorisme de tractament de la colitis microscòpica activa[92]

FISIOPATOLOGIA DE LA CM

La fisiopatologia de la CM és, en general, poc coneguda. La manca de models experimentals, junt amb el fet que tots els estudis sobre la fisiopatologia siguin purament descriptius, fa que encara es desconeixin els mecanismes que provoquen l'inici i la cronificació de la malaltia [103].

Factors genètics

Alguns estudis suggereixen que existeix una certa predisposició genètica a patir CM [103]. Un polimorfisme del gen de la citocina proinflamatòria IL-6 (IL-6-174) podria estar associat a la CM [117].

S'ha associat la presència de l'haplotip DQ2 amb la CM, i aquesta associació és independent de la presència o no de malaltia celíaca, suggerint un solapament entre ambdues malalties [118-120]. És probable per tant que existeixin uns mecanismes immunopatogènics similars entre la CM i la malaltia celíaca [118, 119]. També s'han descrit associacions d'un polimorfisme del gen TNF- α (-308), associat a múltiples malalties autoimmunitàries, amb la CM [118].

Polimorfismes del gen de la metal·loproteïnasa 9 (MMP-9) s'han associat només a CC, i podrien estar relacionats amb una deficient degradació dels dipòsits subepitelials de col·lagen [121].

A diferència de la MII, els polimorfismes del gen NOD2/CARD15 associats a MCrohn no es troben associats a CC [122].

Factors luminals

Es considera que la CM es produeix per una resposta de la mucosa en front a algun antigen luminal, de moment desconegut. Una prova d'això és que la derivació del trànsit fecal mitjançant ileostomia redueix o normalitza els canvis anatomopatològics característics de la CC [115]. Un cop tancada la ileostomia i reconstruït el trànsit fecal, reapareixen les anomalies histopatològiques i es produeix una recidiva clínica [115]. De forma similar, també s'ha observat un increment de la permeabilitat intestinal a macromolècules en la CC, que desapareix amb la derivació del trànsit fecal i reapareix amb la seva reconstrucció [114].

L'antigen luminal nociu podria tenir el seu origen a la microbiota. Un estudi va demostrar una eficàcia terapèutica en el 63% dels casos amb l'ús d'antibiòtics (metronidazol, eritromicina o penicil·lina)[123], recolzant la hipòtesi de la microbiota com a agent causal de la CM. Només hi ha un estudi que hagi avaluat la microbiota

característica de la CM, detectant una reducció de Veruccomicrobia (Akkermansia spp) en front a controls sans. Els valors d'aquest bacteri, que té una funció protectora de l'epiteli, eren més baixos en fumadors que en no fumadors [124].

Alteracions de la resposta immunitària innata

- **Lisozim**

Es detecta un increment de lisozim (pèptid antibacterià) tant a CC com a CL [125], el que reforça la hipòtesi d'un component de la microbiota com a agent causal de la malaltia. La producció de lisozim té diferents orígens segons el subtipus de CM, essent d'origen epitelial (criptes) a la CC i produïda per macròfags de LP a la CL [125], el que demostra l'existència de subtils diferències en la fisiopatologia de les dues formes de presentació de la CM.

- **Òxid nítric**

S'ha descrit tant a la CC [126-128] com a la CL [127, 128] un increment dels nivells d'òxid nítric (NO) a la llum intestinal. Els nivells de NO mesurats correlacionen amb l'activitat clínica [127] i el grau d'inflamació histològica i sembla que la seva producció està limitada a l'epiteli intestinal [127, 129], a diferència d'altres patologies com la CU, en les que es produeix també a LP. L'origen de l'excés de NO està molt ben establert per a la CC, però manquen estudis referents a la CL. S'ha demostrat repetidament un excés d'NO sintasa induïble (iNOS) a la CC [127, 130, 131], i igual que els nivells d'NO, els nivells de mRNA d'iNOS correlacionen amb el grau d'inflamació de la mucosa i l'activitat clínica [131]. A més, el tractament amb budesonida, provoca una davallada dels nivells de mRNA d'iNOS, efecte que no es produeix en els pacients tractats amb placebo [131], suggerint que l'activació d'iNOS i l'augment d'NO luminal tenen un paper molt rellevant en la fisiopatologia de la malaltia. L'activació de l'expressió gènica d'iNOS a la CC està regulada pel factor de transcripció NFκB, que es produeix mitjançant la fosforilació de l'IKK-β, inhibidor de l' NFκB, que un cop alliberat transloca al nucli per a unir-se a la regió promotora del gen de la iNOS [129]. Només hi ha un estudi que mesuri iNOS en mostres de pacients amb CL, i va detectar un

increment en només 2 dels 5 pacients inclosos [132]. Serien per tant necessaris més estudis per a determinar si l'origen de l'ON és el mateix a CC i CL.

- **Alteració de la funció barrera de l'epiteli**

A la CC s'ha descrit també una pèrdua de la funció barrera de l'epiteli, mesurada mitjançant la captació transmucosa d'*Escherichia coli* K12, que es produeix tant en pacients amb malaltia activa com en remissió [133] i que s'agreuja amb nivells baixos d'àcids biliars [134]. Els autors d'aquests estudis suggereixen que els defectes de la funció barrera detectats en pacients en remissió són els que permeten el començament i la perpetuació de la inflamació i podrien explicar els fenòmens de recurrència de la malaltia.

- **Eosinòfils**

Els eosinòfils són leucòcits de nucli bilobulat amb potents funcions proinflamatòries i que es troben incrementats a la LP de pacients amb CM. S'ha demostrat que a més de trobar-se incrementats en nombre, els eosinòfils presents a la mucosa de pacients amb CC activa presenten una major taxa de degranulació [135], una major expressió gènica de TGF- β [136], i graus d'activació i activitat més elevats [137] en comparació amb els controls sans. Quan els pacients amb CC reben tractament amb budesonida i assoleixen la remissió clínica, es redueix el nombre i el grau d'activació dels eosinòfils, malgrat els nivells mai no arriben als dels controls sans [137].

Igual com succeeix amb altres paràmetres immunitaris, el paper dels eosinòfils està molt menys estudiat a la CL que a la CC. En aquest sentit, un estudi peruà que va incloure de manera retrospectiva mostres de 68 pacients amb diagnòstic de CL va determinar que el 76% dels casos presentava un increment del nombre d'eosinòfils de LP, fins al punt que el 51% dels pacients complien criteris de diagnòstic de colitis eosinofílica [138]. Això suggereix que les alteracions en aquest grup cel·lular són comunes als dos grups de CM (CC i CL).

S'ha suggerit que la detecció de proteïnes alliberades per la degranulació dels eosinòfils en femta (proteïna X i proteïna catiònica d'eosinòfil) és útil per al diagnòstic

de CC (però no de CL)[139]. Els nivells d'aquestes proteïnes en femta es redueixen amb el tractament amb budesonida, i la seva mesura podria ser d'utilitat per a avaluar la milloria clínica dels pacients [140].

Alteracions resposta immunitària adquirida

Estudis d'immunohistoquímica [141] i citometria de flux [142] han demostrat que la CM es caracteritza per una infiltració massiva de limfòcits T (CD3⁺) a la CM. També s'ha demostrat repetidament mitjançant estudis d'immunohistoquímica un increment de limfòcits Treg (FOXP3⁺) a la LP [141, 143, 144]. La CC i CL presenten valors de marcadors de proliferació (Ki-67⁺) tant a IEL com a LPL superiors als de controls [141, 142]. A més, els nivells de *T cell Receptor Excision Circle* (TREC, paràmetre que mesura el nivell de "reclutament" de cèl·lules procedent del timus) són iguals o fins i tot presenten una tendència a ser lleugerament inferiors als de controls sans [145]. A altres patologies digestives, com la CU o la diarrea aguda, en canvi, els valors de TREC són significativament superiors als de controls [145]. Per tant, sembla prou clar que l'expansió del nombre de limfòcits a la mucosa dels pacients amb CM és degut a un augment dels nivells de proliferació locals més que no pas a un reclutament de limfòcits de sang perifèrica, i per tant es creu que els nous fàrmacs que actualment s'assagen per a la MII i que tenen com a diana terapèutica el bloqueig de les molècules de *homing* intestinal no serien útils per al tractament de la CM [146].

Un estudi que va avaluar el grau d'activació de limfòcits CD4⁺ i CD8⁺ de mostres de CC activa mitjançant la mesura del grau d'expressió del marcador CD69 (glicoproteïna que s'expressa de manera precoç durant l'activació de limfòcits i cèl·lules NK in vivo i in vitro) per citometria de flux va determinar que les mostres de CC activa presentaven una MFI significativament inferior als controls sans per a cèl·lules CD8⁺, i una tendència a una menor expressió en cèl·lules CD4⁺ [137]. Després d'assolir la remissió clínica amb el tractament amb budesonida, els nivells de CD69 en limfòcits CD4⁺ s'incrementaven fins a recuperar els valors dels controls sans, mentre que a les cèl·lules CD8⁺ els nivells de CD69⁺ s'incrementaven però sense arribar als nivells dels controls [137]. En canvi, a altres patologies d'inflamació intestinal, com la MCrohn o la CU, el marcador CD69 es troba significativament incrementat en

comparació amb controls sans. Aquest estudi [137] demostra que, malgrat la evident infiltració de limfòcits a la LP de pacients amb CC, aquests no presenten ni un grau d'activació normal (comparable a controls sans) ni tampoc una activació incrementada (comparable a MII) i fan imprescindible l'anàlisi funcional dels limfòcits per a poder determinar el significat d'aquestes troballes. En aquest sentit, un estudi innovador que avalua l'efecte de medi de cultiu "condicionat" (procedent de la incubació amb biòpsies o LPMC de pacients amb CM) sobre PBMC d'individus sans demostra que els PBMC estimulats amb medi condicionat amb la biòpsia completa induïx la producció d'IL-10 i de múltiples citocines proinflamatòries (IFN- γ , IL-17-A, IL-1- β , IL-4 i IL-6), mentre que el medi condicionat tan sols amb LPMC aïllades només induïx la síntesi d'IL-17-A i IL-10, suggerint que la capacitat "activadora" de les cèl·lules mononuclears de la LP està atenuada i que hi ha altres components de la biòpsia (epiteli, fibroblasts, dendrítiques, etc) responsables de l'activació de PBMCs [147].

Estudis d'expressió gènica [148-150] han demostrat que existeix un increment dels nivells d'mRNA de citocines relacionades amb l'eix Th-1 (IL-12, IFN- γ , TNF- α) i Th-17 (IL-17-A, IL-23, IL-21), sense diferències entre CC i CL [148, 150]. Arrel d'aquestes troballes s'ha arribat a la conclusió que la CM presenta una activació dels eixos Th1/Th17 [148]. A més els nivells d'mRNA d'IFN- γ correlacionen amb el nombre de deposicions/dia [148, 150] i es normalitzen amb l'assoliment de la remissió clínica [150], suggerint que l'eix Th1 té una gran importància en la fisiopatologia de la malaltia [103]. Malgrat tot, mai s'ha avaluat la presència de cèl·lules Th1 i Th17 a la mucosa de pacients amb CM, i l'únic estudi que avaluat els nivells de proteïna dels gens sobreexpressats no els ha trobat incrementats [148]. En aquest estudi es va justificar la discrepància entre els nivells d'RNA i de proteïna total amb un ràpid consum o una vida mitja molt curta de les citocines produïdes [148]. Tot i així, és freqüent que els nivells d'RNA i proteïna variïn, per exemple un altre estudi que va mesurar un panell de disset quimiocines o els seus receptors en va detectar en algunes un increment en nivells d'RNA però no de proteïna [151], i ja s'ha comentat prèviament que no sembla haver una alteració dels mecanismes de *homing* a la mucosa de la CM. Per tant, i tenint en compte els estudis que suggereixen una activació deficient dels limfòcits de LP és com a mínim qüestionable si realment la CM està mitjançada per un

mecanisme Th1/Th17. En aquest sentit, un estudi d'immunohistoquímica de IL-17-A i IFN- γ sí que detecten un major marcatge en mostres de mucosa de pacients amb CM en comparació a controls sans[152], però aquest increment està degut només a un major marcatge de l'epiteli, i no de cèl·lules de la LP.

Paral·lelismes amb la malaltia celíaca

La CM presenta un increment de l'expressió de molècules MHC-tipus II a l'epiteli [153], que juntament amb l'augment del nombre de LIEs, són trets compartits amb la celiàquia. En canvi, el perfil de reguladors de la transcripció dels limfòcits T de la mucosa és diferent, amb un predomini clar de T-bet (marcador de Th1) a LIEs i LPLs de la malaltia celíaca i un perfil mixt de T-bet i Gata-3 (marcador de Th2) a la CL [154]. Ja s'ha comentat prèviament l'associació de la CM amb HLA-DQ2. Sembla que alguns mecanismes fisiopatològics podrien ser compartits entre celiàquia i CM, però no d'altres.

Alteracions en la funció fibroblàstica i el metabolisme del col·lagen

Aquestes alteracions són exclusives de la CC. La banda col·làgena subepitelial engruixida és el paràmetre histològic que permet el diagnòstic diferencial entre la CC de la CL. Les causes d'aquesta disposició anormal del col·lagen no estan totalment aclarides. S'ha suggerit que existeix un desequilibri entre la fibrinogènesi i la fibrinòlisi que afavoriria l'acumulació de col·lagen a la matriu extracel·lular [155, 156]. Altres estudis suggereixen la presència d'una disfunció fibroblàstica. Els fibroblasts són les cèl·lules encarregades de la síntesi del col·lagen que es diposita a la membrana basal subepitelial i a la CC aquests assumeixen característiques de miofibroblasts [109, 157], i presenten un increment tant en nombre com en complexitat, i podrien ésser al menys en part responsables de la formació de la banda col·làgena subepitelial engruixida [109, 158]. El marcatge amb α -Actina de múscul llis permet distingir aquests fibroblasts amb característiques de miofibroblasts i només està present a pacients amb CC [109, 158]. L'excés de factors de creixement vascular endotelial (VEGF) [159, 160] i de teixit connectiu (CTGF) [161] podrien actuar com a mediadors que afavoririen la transformació dels fibroblasts i l'acumulació de col·lagen a la matriu extracel·lular a la CC.

Sistema nerviós entèric

En pacients amb CC activa es detecten nivells en femta de cromogranina A i B i de secretoneurina molt superiors en comparació amb els controls sans [162], el que suggereix implicació del sistema nerviós entèric en la fisiopatologia de la CC. A més, els valors de secretoneurina disminueixen dràsticament després del tractament amb budesonida i l'assoliment de la remissió clínica[162].

CC i CL: són la mateixa malaltia?

No hi ha consens a la comunitat científica sobre si la CC i la CL són dues malalties independents que comparteixen algunes característiques comunes o bé són diferents estadis de la mateixa malaltia.[97, 104, 163]

A nivell clínic, un estudi retrospectiu suec amb gairebé 800 pacients inclosos, demostra que CC i CL tenen una simptomatologia molt similar, però no idèntica[164]. La CC sembla lleugerament més greu que la CL en el percentatge de diarrea nocturna (28% a CC vs 18% a LC, $p=0.002$) i una major prevalença de troballes endoscòpiques inespecífiques (37% a CC vs 25% a LC, $p=0.001$)[164]. Un metanàlisi demostra que la CC té una major taxa de recurrència (73%, IC95% 69-77 per a CC vs 51%, IC95% 47-55 per a CL)[104].

Sembla per tant que la clínica de la CL és més lleu i té més tendència a desaparèixer de manera espontània en comparació amb la CC [165, 166]. En aquest mateix sentit, l'únic estudi controlat del que es disposa a la CL va demostrar una resposta al placebo molt elevada (48%) [167], mentre que a la CC, segons un metanàlisi Cochane, la resposta al placebo no arriba al 20% [168]. Degut al curs més benigne de la CL, s'ha suggerit que podria ser un estadi precedent de la CC, malgrat que la manca de diferències en l'edat al diagnòstic no recolza aquesta hipòtesi [104].

Els estudis amb colonoscòpies repetides mostren que la conversió entre grups (CL a CC o *viceversa*) és poc freqüent. En un estudi prospectiu que va incloure 27 pacients amb CL i dos anys de seguiment, no es va detectar cap conversió a CC [166]. Dos estudis retrospectius mostren taxes de conversió de grup baixes. En un estudi es va demostrar una taxa de 6% de pacients amb CC que passaven a CL, i un 9% de

pacients amb CL que passaven a CC [169], i en el segon estudi es va demostrar una taxa de canvi de grup del 14% per al total de pacients amb CM [170]. La manca de consistència en el diagnòstic podria ser deguda a un error de mostreig durant la presa de mostres, ja que el 50% de pacients amb CC i el 24% de pacients amb CL presenten canvis incomplets de l'altre grup (és a dir, un engruiximent de la banda col·làgena de 5-10 μm a la CL i un increment del nombre de LIEs (<20) a la CC). Això fa per tant imprescindible mostrejar tot el còlon i indicar el lloc d'obtenció de les mostres per a poder analitzar-les adequadament.

La CM forma part de l'espectre de la MII?

En general es considera que la CM és una forma menor de MII. S'ha suggerit una possible evolució a MCrohn o CU, malgrat la evidència científica és molt escassa. Hi ha alguns estudis de pacients amb MCrohn o CU diagnosticada que desenvolupen CM i viceversa. En tots els casos, es tracta de sèries curtes i amb disseny retrospectiu o de publicacions de casos aïllats, i per tant han de ser interpretats amb cura mentre no es disposi d'estudis prospectius que ho confirmin.

Hi ha evidència publicada en forma de sèries de casos de 5 pacients amb CC confirmada que progressen cap a CU. [171-174], i també d'un cas de CC que desenvolupa MCrohn [175]. En una sèrie sueca de 163 pacients amb CC, el 2.5 % de pacients tenien un diagnòstic previ de MCrohn ($n=3$) o CU ($n=1$), en remissió al moment del diagnòstic de la CC [123]. En aquesta mateixa sèrie, el 16% de pacients presentaven artritis reumatoide, el 14% tenien problemes tiroïdals i el 13% malaltia celíaca, suggerint simplement una associació entre CM i malalties autoimmunitàries més que no pas una associació directa entre CM i MCrohn/CU, i els mateixos autors de l'estudi reconeixen que probablement l'associació amb MII és casual [123]. En una altra sèrie de 199 pacients amb CL, el 12% tenien familiars de primer o segon grau amb patologies digestives (MII, CC o malaltia celíaca), i d'aquests, en el subgrup de pacients amb familiars de primer o segon grau amb MCrohn/CU el diagnòstic de CL es va fer a una edat lleugerament més jove (48 vs 59 anys al diagnòstic, $p=0.01$)[132].

En sentit contrari, en una sèrie retrospectiva de 1000 pacients amb CU als EUA es demostra que 6 pacients amb CU de llarga evolució van presentar en algun moment

del seguiment biòpsia compatible amb CC (n=2) o CL (n=4) [176]. Cal tenir en compte que la mucosa de pacients amb CU inactiva pot presentar canvis inflamatoris inespecífics focals que podrien ser mal interpretats com a CM, especialment si la presa de mostres durant la colonoscòpia es insuficient [177]. Això és especialment cert per a la CL, ja que múltiples patologies poden provocar un increment del nombre de limfòcits intraepitelials sense acomplir criteris estrictes de CL, conduint cap a diagnòstic erroni de CM en pacients que només presenten una lleu inflamació inespecífica [178].

Tenint en compte a més, que a la MCrohn i la CU la ratio entre sexes és similar, mentre que a la CM hi ha un clar predomini del sexe femení; que la MCrohn/CU debuta a les primeres dècades de la vida, mentre que la CM és més freqüent a partir dels 50-60 anys; i que la diarrea mai és sanguinolenta a la CM, no sembla que hi hagi actualment motius per a considerar la CM com a part de l'espectre de la MCrohn/CU.

OBJECTIUS

Do· Or do not· There is no try·

Master Yoda (*The Empire strikes back*)

OBJECTIUS:

1. Caracteritzar la resposta immunitària específica de cèl·lules T efectores (Th1 i Th17), cèl·lules Treg (Treg) i limfòcits DP i DN i el perfil de citocines associat a diferents compartiments intestinals a la mucosa sana i a diferents malalties inflamatòries intestinals (malaltia de Crohn, colitis ulcerosa, colitis infecciosa, colitis microscòpica).

2. Avaluar el perfil de limfòcits de sang perifèrica (PBMC) en diferents patologies intestinals (malaltia de Crohn, colitis ulcerosa, colitis infecciosa, colitis microscòpica) per a determinar si les respostes immunitàries locals de l'intestí es veuen reflectides al compartiment sistèmic.

3. Quantificar el grau d'apoptosi dels limfòcits intestinals en diferents regions del budell, en mucosa sana i en diferents malalties inflamatòries intestinals (malaltia de Crohn, colitis ulcerosa, colitis infecciosa, colitis microscòpica).

4. Caracteritzar les diferències en la resposta immunitària específica de cèl·lules T efectores (Th1 i Th17), cèl·lules Treg (Treg) i limfòcits DP i DN i el perfil de citocines a CC i la CL.

RESULTATS

*Leonard, prepare to be humbled and weep at the glory of my genius.
Look at it! I feel like my mind just made a baby. And it's beautiful!*

Sheldon Cooper,
(The big bang theory, episode 7x06, The romance resonance)

ESTUDI 1:

Especialització regional de les subpoblacions de limfòcits T i la seva taxa d'apoptosi a la mucosa intestinal humana: diferències entre ílium i colon a la mucosa sana i a les malalties inflamatòries intestinals

Resum

Introducció: La informació sobre les diferències en la resposta immunitària específiques de cada regió intestinal és escassa. L'objectiu va ser determinar les diferències en la resposta immunitària a dos compartiments intestinals (ílium i colon) a mucosa intestinal sana i inflamada.

Mètodes: Es va mesurar el perfil de limfòcits T i la seva taxa d'apoptosi mitjançant citometria de flux (Th1, Th17, DP, DN i Treg), immunohistoquímica (FOXP3 i Caspasa-3) i PCR en temps real (IFN, IL-17-A, FOXP3) a biòpsies procedents de diferents regions d'intestí sa i de diferents malalties inflamatòries intestinals.

Resultats: El colon sa va presentar un percentatge superior de cèl·lules Th17, Treg i DN, i un menor percentatge de DP en comparació amb l'ílium sa. Algunes, però no totes, de les diferències depenents de localització es van perdre en condicions d'inflamació. Es van trobar patrons específics de malaltia: patró Th1/Th17 a la malaltia de Crohn i patró Th17 a la colitis ulcerosa, mentre que a la colitis microscòpica es troba una marcada reducció de la resposta Th1/Th17. Les cèl·lules DN van comportar de manera oposada a les Th1/Th17, estant reduïdes a la malaltia de Crohn i incrementades a la colitis microscòpica. Es van detectar nivells d'apoptosi superiors a la mucosa de colon sa en comparació amb la mucosa ileal sana. Totes les formes d'inflamació del còlon van presentar una marcada davallada de la l'apoptosi en comparació amb el còlon sa. En canvi, la malaltia de Crohn ileal va presentar nivells de caspasa3 superiors a l'íleum sa.

Conclusions: Hi ha diferències en la resposta immunitària en diferents regions del tracte digestiu. El procés inflamatori sobrepassa i supera algunes d'aquestes diferències, però altres es mantenen. Les diferències específiques de localització s'han de tenir en compte quan s'estudia la inflamació intestinal.

Original Article

Regional Specialisation of T Cell Subsets and Apoptosis in the Human Gut Mucosa: Differences Between Ileum and Colon in Healthy Intestine and Inflammatory Bowel Diseases

Anna Carrasco,^{a,b} Fernando Fernández-Bañares,^{a,b} Elisabet Pedrosa,^a Antonio Salas,^{b,c} Carme Loras,^{a,b} Mercè Rosinach,^{a,b} Montserrat Aceituno,^a Xavier Andújar,^{a,b} Montserrat Forné,^{a,b} Yamile Zabana,^{a,b} Maria Esteve^{a,b}

^aDepartment of Gastroenterology, Hospital Universitari Mutua Terrassa, Universitat de Barcelona, Catalonia, Spain

^bCentro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas [CIBERehd], Barcelona, Catalonia, Spain ^cDepartment of Pathology, Hospital Universitari Mutua Terrassa, Universitat de Barcelona, Catalonia, Spain

Corresponding author: Maria Esteve, MD, PhD, Department of Gastroenterology, Hospital Universitari Mútua de Terrassa, University of Barcelona, Pl. Dr. Robert 5, 08221 Terrassa, Barcelona, Catalonia, Spain. Tel: [+34] 93 736 50 50; fax: [+34] 93 736 50 43; email: mestevecomas@telefonica.net

Abstract

Background and Aims: There is very limited information regarding region-specific immunological response in human intestine. We aimed to determine differences in immune compartmentalisation between ileum and colon in healthy and inflamed mucosa.

Methods: T cell profile and its apoptosis were measured by flow cytometry, Th1, Th17, Treg [CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺], double positive [DP, CD3⁺CD4⁺CD8⁺] and double negative T cells [DN, CD3⁺CD4⁻CD8⁻], immunohistochemistry [FOXP3, caspase-3], and real-time polymerase chain reaction [PCR] [IFN- γ , IL-17-A, and FOXP3] on biopsies from different regions of healthy intestine and of intestine in inflammatory bowel diseases.

Results: Healthy colon showed higher percentages of Treg, Th17, and DN, and lower numbers of DPT cells compared with ileum [$p < 0.05$]. Some but not all region-specific differences were lost in inflammatory conditions. Disease-specific patterns were found: a Th1/Th17 pattern and a Th17 pattern in Crohn's disease and ulcerative colitis respectively, whereas a reduction in Th1/Th17 was found in microscopic colitis. In colonic Crohn's disease and microscopic colitis, DN T cells had a pattern inverse to that of Th1/Th17 (increase in microscopic colitis [$p < 0.05$] and decrease in Crohn's disease [$p < 0.005$]). Higher levels of lymphocyte apoptosis were found in healthy colon compared with the ileal counterparts [$p = 0.001$]. All forms of colonic inflammation presented a dramatic decrease in apoptosis compared with healthy colon. By contrast ileal Crohn's disease showed higher levels of cleaved-Caspase⁺ CD3⁺ cells.

Conclusions: Immunological differences exist in healthy gastrointestinal tract. Inflammatory processes overwhelm some location-specific differences, whereas others are maintained. Care has to be taken when analysing immune response in intestinal inflammation, as location-specific differences may be relevant.

Keywords: Intestinal compartmentalization; apoptosis; intestinal lymphocytes



1. Introduction

The mucosal immune system of the healthy intestine has to maintain the balance between tolerogenic and pro-inflammatory immune responses. Each region of the intestine has unique characteristics related to specific functions and differential predominant antigens.¹ The small bowel has to deal with a huge amount of dietary antigens, whereas the colon has the highest bacterial content of the microbiota. Thus, the mucosal milieu has to adapt to the potential injurers specific to each segment without triggering an exacerbated response.¹ Imbalance of this tightly regulated immune response leads to disease.

In spite of the pathophysiological relevance of the subject, few studies^{2,3,4} have assessed differences in the lymphocyte profile between different parts of the gut, both in the healthy intestine and in the inflamed. Recently, a study comparing colonic and ileal dendritic cells demonstrated substantial compartment-specific differences,⁵ revealing regulatory properties in the colon that are absent in the ileum. It is currently unknown whether these location-specific differences are maintained in conditions that may affect different sections of the intestine, such as Crohn's disease [CD].

In the present study we aimed to provide an integrated view of the effector-regulatory balance of the mucosal immune function that occurs in healthy subjects and in patients with different inflammatory conditions, and to determine the differences in immune compartmentalisation between ileum and colon. We assessed Th1/Th17 and Treg [CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺] responses as paradigms of effector and regulatory functions, respectively.⁶ Their role in the pathophysiology of chronic inflammation, mainly in CD, has been clearly demonstrated.⁷ Besides these conventional T cell subsets, atypical and less-known T cells such as double positive T cells [DP, CD3⁺CD4⁺CD8⁺] and double negative T cells [DN, CD3⁺CD4⁺CD8⁻] may also exert regulatory and effector functions. DP and DN are two rare and poorly characterised cell subsets that could be of relevance in healthy and inflamed mucosa. Their function and distribution in the human gastrointestinal [GI] tract are currently unknown.¹

Cell death through apoptosis has been described as being a major regulatory mechanism to maintain unresponsiveness to harmless intestinal antigens in the healthy mucosa.⁸ Impaired apoptosis mechanisms may partly contribute to a lymphocyte accumulation due to a defective clearance in the inflamed intestine.^{8,9,10} However, despite the importance of apoptosis in mucosal homeostasis, it is currently unknown whether this regulatory mechanism works in the same manner along the gastrointestinal tract in healthy and inflamed mucosa.

The specific aims of this study were to characterise the compartment-specific immune response in both healthy and inflamed intestine by assessing effector T cells [Th1/Th17], unconventional T cells [DP and DN T cells], and regulatory T cells [Treg]. T cell apoptosis was also measured as being representative of regulatory mechanisms. In addition, lymphocyte profile of the systemic compartment was evaluated in inflammatory diseases to uncover whether local immune responses are reflected in peripheral blood.

2. Patients and Methods

2.1. Patients and controls

Patients were included and classified according to the following groups representative of different forms of inflammatory bowel disease [IBD] and non-IBD inflammation: 1) CD [$n = 23$; 13 females, aged 36 ± 16 years], 19 newly diagnosed and 4 previously diagnosed [years from diagnosis: median 3 years, range 1–6]; 2) ulcerative colitis [UC] [$n = 7$; 3 females, aged 43 ± 14 years]; 3) infectious colitis

[IC] [$n = 5$; 4 females, aged 32 ± 12 years] as non-IBD intestinal inflammation; 4) microscopic colitis [MC] [$n = 23$], a minor form of IBD, 15 had collagenous colitis [14 females, aged 53 ± 12 years] and 8 had lymphocytic colitis [4 females, aged 65 ± 11 years].

Additionally, healthy controls were also included [$n = 20$; 10 females, aged 49.5 ± 8.8 years]. The colonoscopy in healthy controls was performed because of haematochezia due to haemorrhoids or was indicated in the setting of colon cancer screening of the general population. All patients from groups 1–4 had active disease and were not receiving any treatment at the time of inclusion. The diagnosis of IBD, UC or CD or MC, was based on established diagnostic criteria.^{11,12,13} Active disease was clinically defined in CD as a Crohn's Disease Activity Index [CDAI]¹⁴ ≥ 150 and endoscopic activity defined by Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease [SES-CD]¹⁵ partial score ≥ 2 . In UC, active disease was defined as a Mayo Clinic score¹⁶ ≥ 4 with an endoscopic subscore ≥ 2 . Infectious colitis [IC] patients had sudden onset, acute diarrhoea, fever, and positive inflammatory markers at the time of inclusion. The aetiological agents in IC were in two cases *Salmonella enteritidis*, in one case *Clostridium difficile*, in one *Campylobacter jejuni*, and there was one case of self-limited colitis with negative culture. Microscopic colitis [MC] patients had ≥ 3 watery stools per day, and specific microscopic abnormalities were evaluated by an expert pathologist [AS]. Not all the samples were used in all the experiments. Specific sample size for each experiment is specified in the figure legends.

2.2. Sample collection

Paired endoscopic sample biopsies of different intestinal areas were taken from the healthy control group: 10 biopsies from the ileum, 10 from the right colon, and 10 from the left colon. In patients with intestinal inflammation, 20 biopsies from the inflamed area were taken. In patients with CD, endoscopic sample biopsies were obtained from the ileum in nine patients, from the right colon in eight patients, and from the left colon in the remaining six patients. In all seven patients with UC and in the 23 patients with MC, biopsies were taken from the left colon beyond the rectum. In the five patients with IC, samples were taken from the involved areas, left colon in three cases and right colon in two cases. Biopsy samples were obtained using large-capacity biopsy forceps [Radial Jaw 4, Boston Scientific, USA]. PEG cleansing solutions for bowel preparation were used in all cases. All patients and controls provided written informed consent. The ethical committee of our institution approved this study.

2.3. Lymphocyte isolation

For lymphocyte isolation purposes, 10 biopsies were processed with a smooth enzymatic method as previously described.^{17,18} Briefly, biopsies were collected in culture media and immediately processed with 1 mM DTT and 1 mM EDTA for mucus clearance, and then placed in fresh media with a low-dose enzymatic cocktail: 0.5 $\mu\text{g/ml}$ each of collagenase [type V-S, 0.2 enzymatic unit/ml], hyaluronidase [type IV-S, 0.7 enzymatic unit/ml], and deoxyribonuclease [type I, 1 enzymatic unit/ml], all from Sigma Aldrich, and left overnight [16.5 h] at 37°C with moderate shaking. After that, the overnight supernatant, containing a mixture of intraepithelial and lamina propria lymphocytes, was centrifuged, counted under a haemocytometer chamber, and re-suspended at a final concentration of 1×10^6 lymphocytes/ml. By using this method, cell viability is $\geq 90\%$.¹⁷ Peripheral blood mononuclear cells [PBMC] were isolated by Fycol centrifugation as described elsewhere.¹⁹

2.4. Flow cytometry

Previously titrated amounts of the following antibodies were used for surface staining: anti-TCR $\alpha\beta$ -FITC [clone WT31], anti-CD8-PE [clone SK1], anti-TCR $\gamma\delta$ -FITC or PE [clone 11F2], anti-CD3-PerCP [clone SK7], and anti-CD45-APC [clone 2D1], all from BD Biosciences [NJ, USA]; and anti-CD8-APC [clone 3B5] from Invitrogen [CA, USA]. Surface staining was done at room temperature with a 15-min incubation. For Treg staining, the PE Anti-Human FOXP3 Staining Set kit [eBioscience, CA, USA] was used following the manufacturer's instructions. For intracellular cytokine staining, cells were placed in culture with 10 ng/ml PMA, 100 ng/ml Ionomycin, and 10 ng/ml Brefeldin A [Sigma Aldrich, MO, USA] for 4 h. The FIX & PERM cell fixation and permeabilisation kit [Caltag Medsystems, Buckingham, UK] was used. Intracellular antibodies were anti-human-IFN- γ [clone 4S.B3] and anti-human-IL17A [clone eBio64] [both from eBioscience, CA, USA]. For apoptosis measurement, two different strategies were used: intracellular staining of cleaved caspase-3 [clone C92-605, BD Biosciences, NJ, USA] and AnnexinV/7AAD staining [PE Apoptosis detection kit, BD Biosciences, NJ, USA]. Appropriate isotype-matched controls from the same vendors were included in intracellular staining in order to ensure proper compensation and staining specificity. Acquisition of data was undertaken in a FACSCalibur 4-colour flow cytometer [BD], and analysis was done using Cell-QuestPRO Software. A conventional gating strategy was used. First, live lymphocytes were selected based on forward and side scatter properties, excluding those presenting a reduction in FSC and/or SCC, suggestive of apoptotic or dead cells. Then a second gate was drawn over a main lineage marker [either CD3⁺ or CD3⁺CD4⁺ or CD3⁺CD8⁺]. Results were expressed in percentages of the lineage marker/low SSC gate.

2.5. Immunohistochemistry

Two biopsies were fixed in formaldehyde and embedded in paraffin using Histocentre [Thermo, Waltham, MA, USA]. Sections [4 μ m thick] were stained with anti-cleaved-caspase3 rabbit polyclonal antibody [sc-7148, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA] and anti-FOXP3 mouse monoclonal antibody [clone 236A/E7, Novus Biologicals, CO, USA] with an ultra-view Universal DAB detection kit in the automated stainer BenchMark ULTRA [Ventana Medical Systems, Roche, USA], following the manufacturer's instructions. Semi-quantitative scoring of the caspase-3 immunohistochemistry [IHQ] expression using a scale from 0 to 3 was done in two regions, subepithelial domain and the lamina propria, using the following scale as previously described¹⁸: 0 = absence of staining; 1 = 1–5 positive cells per field; 2 = 6–20 positive cells per field; and 3 = more than 20 positive cells per field, at a 200x magnification. Cell counts of FOXP3 positive cells were done in 10 high-power fields in each sample and were expressed as median [percentile 25–75].

2.6. RNA extraction and relative quantification by real-time PCR

Two biopsies were placed on RNA Later [Ambion, USA] and stored at -80°C until analysis. Biopsies were disrupted with Qiazol reagent [Qiagen, Hilden, Germany] with the Gentle MACS Dissociator [Milteny Biotec, Gladbach, Germany]. Total RNA was extracted with miRNeasyMini kit and the Qiacube automated sample preparer [Qiagen, Hilden, Germany], following the manufacturer's instructions. Combined primers and probes were purchased from Integrated DNA Technologies [Iowa, USA]: HPRT [Hs.PT.58v.46521572], IFN- γ [Hs.PT.53a.26729425], IL-17-A [Hs.PT.53a.2545178], and FOXP3 [Hs.PT.53a.4225152]. Reactions were performed in a 7300 PCR system

[Applied Biosystems, CA, USA] and the Premix Ex Taq [TAKARA, Japan], following the manufacturer's instructions. All reactions were performed in triplicate. Relative values [expressed as fold change relative to control group] were calculated with the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.²⁰ Every gene of interest was normalised against an endogenous control [reference gene, HPRT] and values were related to the left colon control group.

2.7. Statistics

All numerical data are expressed as mean \pm SD or median [interquartile range]. Paired data from healthy controls were analysed with the non-parametric Friedman's analysis of variance test and the Wilcoxon test. To assess differences between groups of patients, the non-parametric Kruskal-Wallis test and the Mann-Whitney U test were used. Spearman correlation was used to evaluate the statistical relationship between parameters. A p -value < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Th1 and Th17 pattern in colonic and ileal samples of healthy controls

Th1 and Th17 cells have critical roles in mucosal defence and in several immune-mediated diseases. Only one report has assessed the presence of Th1 and Th17 cells in healthy intestine by flow cytometry [FCM], showing higher levels of Th17 cells in caecum compared with left colon and terminal ileum.³ By contrast, two studies assessing gene expression had controversial findings, with higher levels of IL-17-A expression in the ileum compared with the colon in one report²¹ and no differences in the other.²² Herein we analysed Th17 lymphocytes [Figure 1A] and IL-17A gene expression in the same mucosal samples.

We found that Th17 cells were significantly increased in the colon, in both right and left regions, compared with their paired terminal ileum samples [Supplementary Figure 1A, available as Supplementary data at ECCO-JCC online]. These differences were detected in both stimulated and non-stimulated culture conditions [Supplementary Figure 1A]. These results are similar to those found in the above-mentioned study in which Th17 cells were increased only in the caecum.³ Regarding gene expression, a tendency toward higher ileal expression was found [Supplementary Figure 1B] in accordance with the results of one of the previous studies.²² However, statistical significance was not achieved, probably due to the large variability in IL-17-A mRNA expression. This wide variability was also previously observed²¹ and may partly explain the discrepancies among reports.

Regarding Th1 response, no differences were found in the percentages of Th1 cells in the different intestinal areas [Supplementary Figure 1C]. IFN- γ expression showed a similar trend to IL-17-A expression, with higher values in the ileal mucosa than in the colonic mucosa. However, high inter-individual variability, as observed for IL-17-A expression, prevented reaching statistical significance [Supplementary Figure 1D].

Overall, Th17 response but not Th1, seems to be increased along the entire colon compared with the ileum in healthy intestine. However, differences are subtle compared with the magnitude of the increase observed in certain inflammatory conditions [see below].

3.2. Th1 and Th17 response in ileal and colonic inflammation

Th1 and Th17 response was assessed in inflammatory diseases affecting both the ileum and colon. Gene expression of both IL-17-A and IFN- γ was markedly increased in all forms of intestinal

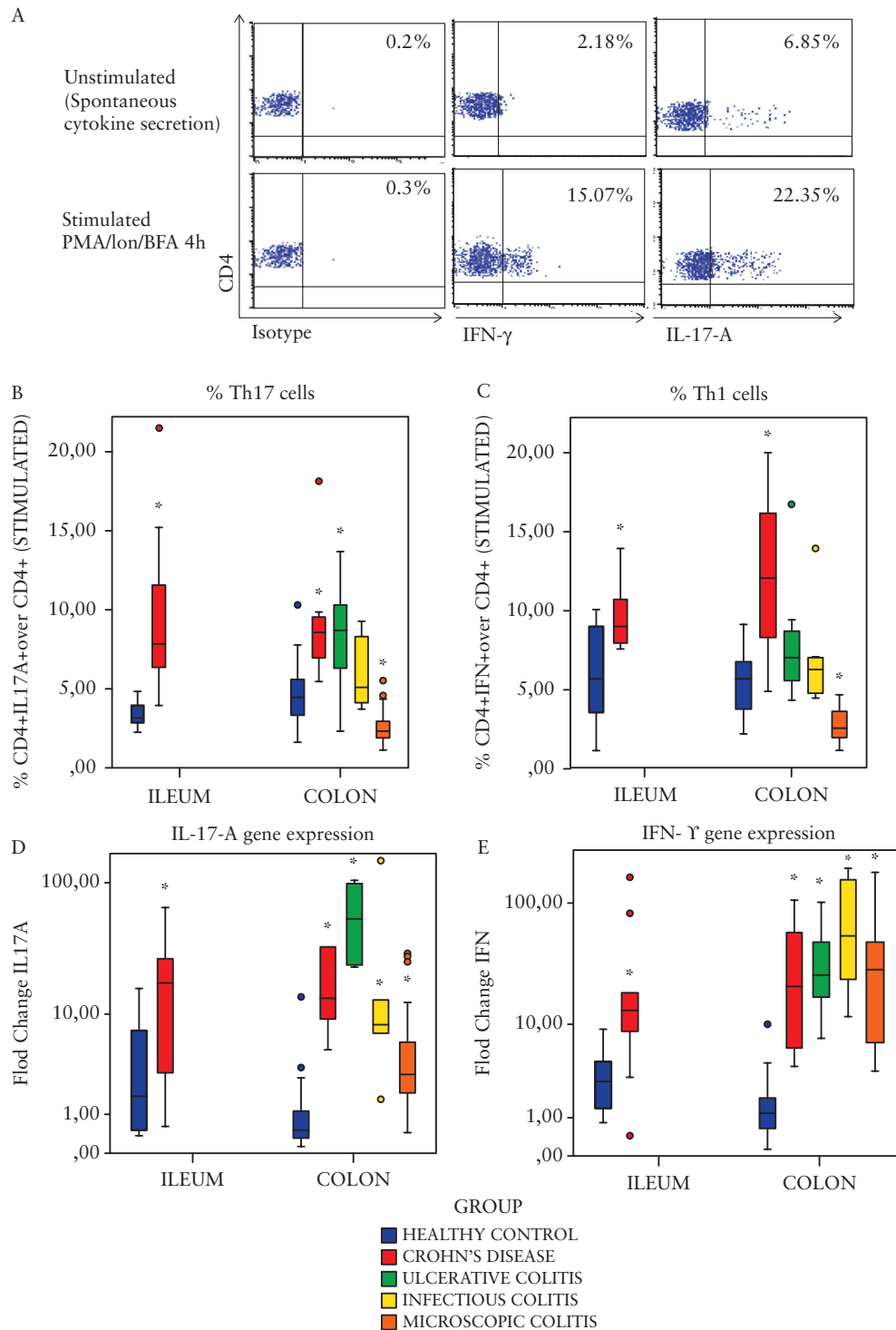


Figure 1. Th1 and Th17 cells were identified by intracellular flow cytometry after culture with/without PMA/Ionomycin/Brefeldin-A stimulation. A) Representative intracellular staining of IFN γ and IL-17-A and its appropriate isotype control from a Crohn's disease patient sample with and without stimulation. Th1 and Th17 cells were gated over CD3⁺CD4⁺T cells. Percentages of Th17 cells [B] and Th1 cells [C] from ileal healthy mucosa [$n = 10$], ileal Crohn's disease [$n = 7$], healthy colonic mucosa [$n = 20$], colonic Crohn's disease [$n = 8$], ulcerative colitis [$n = 7$], infectious colitis [$n = 5$], and microscopic colitis [$n = 23$] patients. IL-17-A [D] and IFN- γ [E] gene expression from ileal healthy mucosa [$n = 8$], ileal Crohn's disease [$n = 9$], healthy colonic mucosa [$n = 18$], colonic Crohn's disease [$n = 12$], ulcerative colitis [$n = 7$], infectious colitis [$n = 5$], and microscopic colitis [$n = 23$] patients; * $p \leq 0.05$ vs controls.

inflammation, [Figure 1D and E respectively] irrespective of the location of the disease. By contrast, Th17 cells were increased only in IBD inflammation [both UC and CD], but not in IC, whereas Th1 cells were only increased in CD but not in UC or IC [Figure 1B and

C]. Similar results were obtained in both unstimulated and PMA/Ionomycin-activated cultures [data not shown]. These results are in agreement with previous studies showing a Th1/Th17 pattern in CD and a Th17 pattern in UC.²¹ By contrast, despite increased gene

expression of both IL-17-A and IFN- γ , Th1 and Th17 cells were decreased in MC [both LC and CC] [Figure 1B and C]. Thus, the increment or decrement in effector Th1 and Th17 lymphocytes in the inflamed gut is disease-dependent and unrelated to the location of the disease.

As occurs in healthy mucosa, gene expression levels of IFN- γ and IL-17-A in inflamed mucosa did not parallel with Th1 and Th17 cells. Thus, to have a complete perspective of Th1 and Th17 response it is important to analyse both parameters simultaneously.

No differences were found in peripheral Th1 and Th17 lymphocytes between patients with inflammatory conditions and healthy controls [Supplementary Figure 2A and B, available as Supplementary data at ECCO-JCC online].

3.3. Healthy and inflamed ileum is enriched in double positive T [CD3⁺CD4⁺CD8⁺] cells

A higher proportion of DP T cells was detected in the ileal mucosa compared with colonic mucosa in healthy controls [Figure 2A and Supplementary Figure 3A, available as Supplementary data at ECCO-JCC online]. Interestingly, this difference related to the location between the ileal and colonic mucosa was maintained in inflamed mucosa, with a greater proportion of DP T cells in ileal CD compared with colonic CD [$p = 0.016$] [Figure 2C]. In addition, no differences

were found between the different forms of colonic inflammation and the healthy colon, either between normal ileal mucosa or ileal CD [Figure 2C]. These data suggest that DP T cells may have a homeostatic role which is not influenced by inflammation. No differences in DP T cell percentages were found in PBMCs among groups [Supplementary Figure 2D, available as Supplementary data at ECCO-JCC online].

3.4. Double Negative T cells [CD3⁺CD4⁻CD8⁻] are increased in healthy colon, and could be of importance in Crohn's disease and microscopic colitis pathogenesis

DN T cells include several subsets of unconventional lymphocytes, such as MAIT T cells, iNKT, and TCR $\gamma\delta^+$ T cells, the distribution and function of which in the healthy intestine are poorly understood.¹ We found that in the healthy intestine, DN cells are distributed mirroring DP cells, with a greater proportion of this cell group in the colon compared with the ileum [Figure 2A and Supplementary Figure 3B]. Moreover, in contrast to what happens with DP T cells, a specific disease pattern of DN cells is observed, showing a decrease in colonic CD mucosa and an increase in MC [both LC and CC] compared with healthy colon [Figure 2B]. No differences were found between ileal CD and healthy ileum [Figure 2B]. These differences

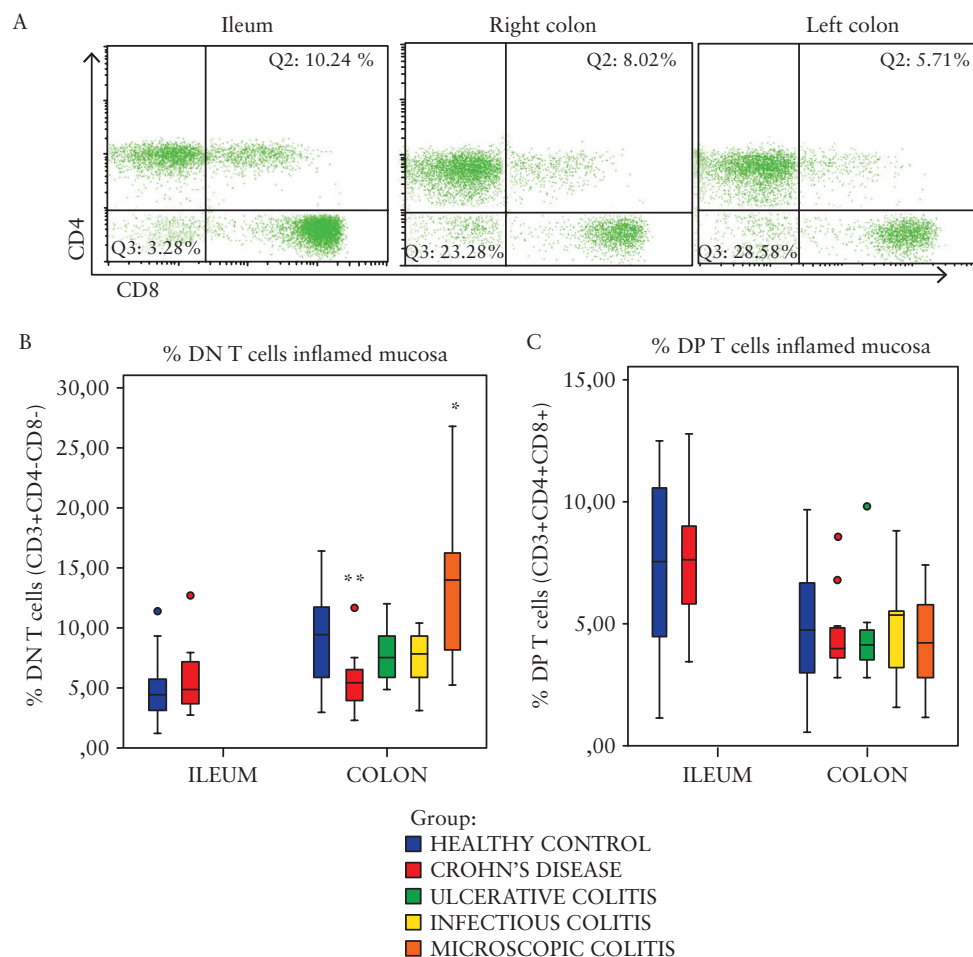


Figure 2. Identification of double positive [DP] and double negative [DN] T cells by flow cytometry in human gut. A) DP and DN T cells gated over total T lymphocytes [CD3⁺] in healthy mucosa. Graphs are representative of several independent experiments. Percentages of DNT cells [B] and DPT cells [C] from ileal healthy mucosa [$n = 16$], ileal Crohn's disease [$n = 8$], healthy colonic mucosa [$n = 34$], colonic Crohn's disease [$n = 11$], ulcerative colitis [$n = 7$], infectious colitis [$n = 5$], and microscopic colitis [$n = 14$] patients; § $p < 0.005$ vs healthy control; * $p < 0.05$ vs healthy control.

related to the type of disease suggest a role in the pathophysiology of certain forms of colonic inflammation. In PBMC, a significant reduction of DN T cells was also observed only in CD patients compared with healthy controls [$p = 0.042$] [Supplementary Figure 2C], irrespective of the location of the disease. No differences in peripheral DN T cell percentages were observed in the remaining inflammatory conditions [Supplementary Figure 2C].

3.5. Treg are increased in the healthy right colon

CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T cells [Treg] are considered an immunoregulatory cell subset²³ of crucial importance in intestinal mucosal homeostasis.²⁴ Their presence was assessed by FCM [Figure 3A], the expression level of their master transcription factor [FOXP3] by RT-PCR, and the protein FOXP3 expression by IHQ [Figure 4]. In healthy mucosa, percentages of Treg cells were slightly higher in the right colon in comparison with the ileum and left colon [Figure 3B], whereas a similar pattern was found when protein FOXP3 expression was assessed by IHQ [Figure 4]. This observation is in agreement with previous reports that found a greater proportion of Treg cells in the human caecum,³ where the bacterial load is higher and therefore a tolerogenic immune milieu is required. By contrast, no differences were found in FOXP3 gene expression among the three regions [Figure 3C].

3.6. Treg are increased in all IBD-forms of chronic intestinal inflammation, but not in infectious colitis

All forms of intestinal inflammation except for IC presented significantly higher levels of Treg cells [CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺] as compared with healthy mucosa, in both ileum and colon [Figure 3D]. Taking into account the above-mentioned regional differences, samples of inflamed mucosa of the different intestinal compartments [ileum and right and left colon] were compared with their respective healthy counterparts. Higher Treg percentages were found in inflamed intestine compared with healthy mucosa, irrespective of the location and the type of disease [data not shown]. As occurs with effector cells [Th1/Th17], the magnitude of Treg cell increase in chronic inflamed intestine overcame the differences related to location that are observed in healthy mucosa. In addition, similar findings were found when FOXP3 was assessed by gene [Figure 3E] and protein expression levels [Figure 4]. All forms of IBD, including MC, showed higher values than those seen in healthy mucosa. By contrast, no differences were found in IC regarding Treg cells and FOXP3 protein levels, though the gene expression was increased. There was an acceptable correlation between Treg subset percentages [FCM], FOXP3 gene expression [PCR], and protein expression [IHQ] [Spearman correlation: IHQ vs FCM, $r^2 = 0.548$, $p < 0.001$;

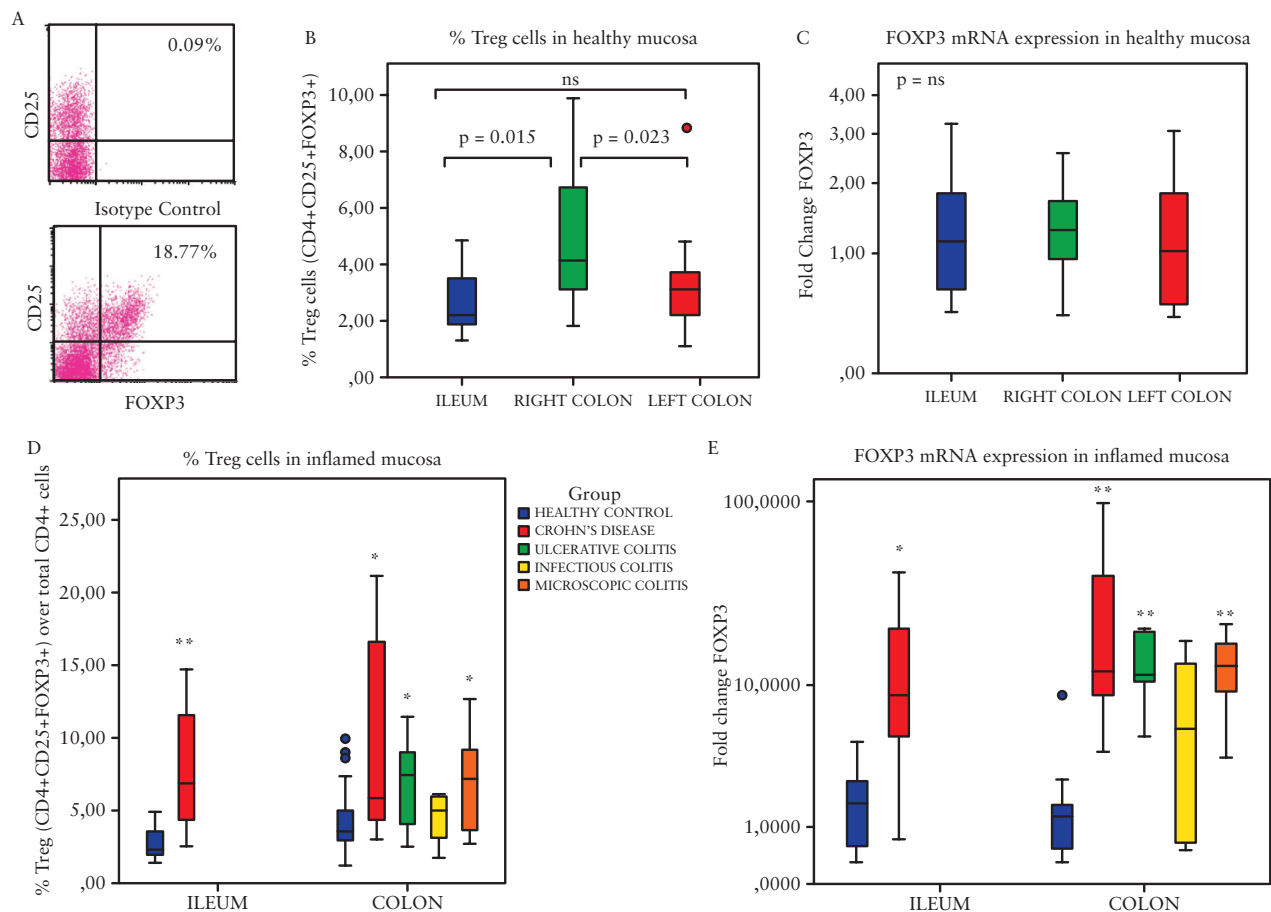


Figure 3. Regulatory T cells [Treg] in human gut. A) Representative intracellular staining of FOXP3 transcription factor and its appropriate isotype control from a Crohn's disease patient sample. CD25⁺FOXP3⁺ T cells [Treg] were gated on total CD4⁺ T cells. Percentages of Treg cells in healthy [B] and inflamed [D] intestine from healthy controls [$n = 15$], ileal Crohn's disease [$n = 7$], colonic Crohn's disease [$n = 7$], ulcerative colitis [$n = 6$], infectious colitis [$n = 4$], and microscopic colitis [$n = 23$] patients. FOXP3 gene expression measured by real-time PCR on healthy [C] and inflamed intestine [D] from healthy controls [$n = 8$], ileal Crohn's disease [$n = 9$], colonic Crohn's disease [$n = 13$], ulcerative colitis [$n = 7$], infectious colitis [$n = 5$], and microscopic colitis [$n = 23$]; ** $p < 0.005$ vs healthy control; * $p < 0.05$ vs healthy control.

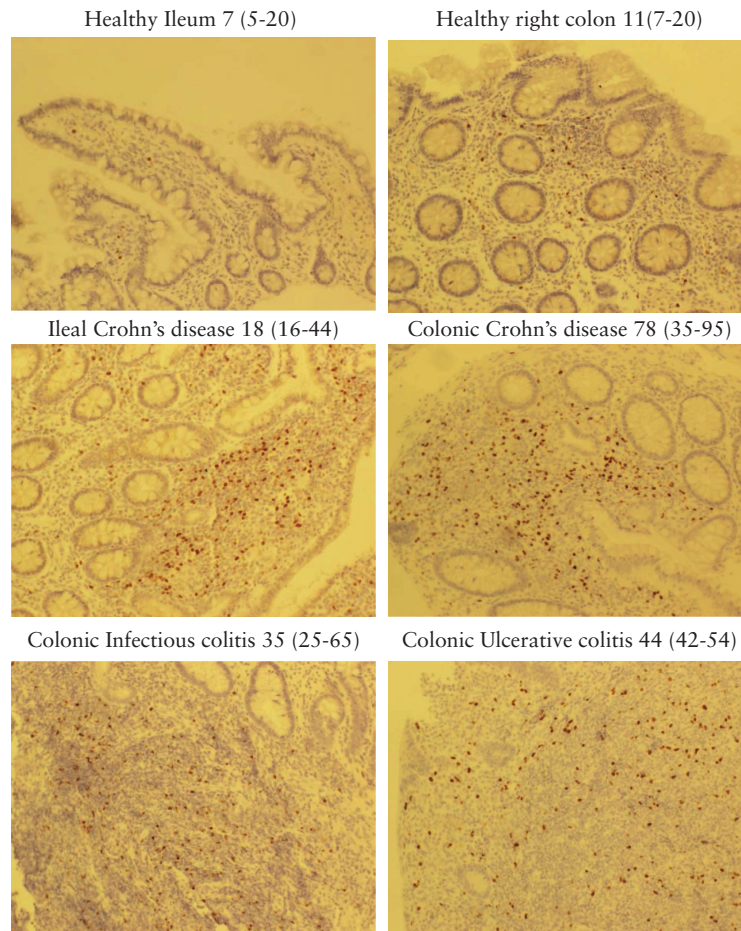


Figure 4. FOXP3 immunohistochemical staining. Representative images of paired healthy control mucosa [ileum, right and left colon, $n = 8$], ulcerative colitis [$n = 7$], infectious colitis [$n = 4$], ileal Crohn's disease [$n = 9$], right colon Crohn's disease [$n = 6$], and left colon Crohn's disease [$n = 7$]. Positive control was tonsil. Negative controls were done omitting the primary antibody. Cell counts were done in 10 high-power fields in each sample and were expressed as median [percentile 25–75].

FCM vs RT-PCR, $r^2 = 0.461$, $p < 0.001$; PCR vs IHQ, $r^2 = 0.441$, $p = 0.001$. No differences were found in the systemic compartment in any of the inflammatory conditions in comparison with healthy controls [Supplementary Figure 2E].

3.7. Lymphocyte apoptosis is increased in the healthy colon compared with the terminal ileum

Taking into account the pathogenic relevance of apoptosis in some inflammatory conditions such as CD, involving the entire gastrointestinal tract, we aimed to learn if there were differences in T cell apoptosis in different intestinal compartments. To ensure the reliability of the results, apoptosis levels were determined by two complementary techniques: AnnexinV staining in the cell membrane by FCM, and intracellular detection of cleaved-caspase-3 by FCM and IHQ. AnnexinV⁺/7AAD⁻ cells and AnnexinV⁺/7AAD⁺ cells reflect early and late apoptotic stages, respectively, whereas AnnexinV⁺/7AAD⁺ cells are considered dead/necrotic cells [Supplementary Figure 4, available as Supplementary data at ECCO-JCC online]. Cleaved caspase-3 is a late effector player in the apoptotic process, although it has recently also been related to autophagic processes.²⁵

Colonic samples showed higher levels of apoptosis compared with their ileal paired samples. Both total T cells [CD3⁺] and helper T cells [CD3⁺CD4⁺] presented higher levels of early [AnnexinV⁺

/7AAD⁻] and late [AnnexinV⁺/7AAD⁺] apoptosis in colon compared with ileum [Figure 5A-D]. In addition, left colon samples presented higher apoptotic levels [both early and late] compared with right colon, suggesting that the apoptotic clearance mechanism is increased in a distal manner throughout the intestine [Figure 5A-D]. Similar but less prominent results are found in the cytotoxic CD3⁺CD8⁺ T cell population [Figure 5E-F]. Considering apoptosis as the main mechanism of down-regulation of the immune response, it makes sense that the effector pro-inflammatory cell types [helper] are more affected than others [suppressors] by the above-mentioned clearing system. In the same way, higher percentages of cleaved caspase-3⁺ (over total lymphocyte gate and over both regions, CD3⁺ [T cells] and CD3⁺ [innate lymphoid cells and B lymphocytes]) were found in the colon compared with the ileum [Figure 5G-I]. These results were confirmed by IHQ [Figure 6].

3.8. Apoptosis is reduced in all forms of colonic inflammation, but not in ileal CD

Ileal and colonic CD had opposite behaviours regarding lymphocyte apoptosis levels. Ileal CD showed higher levels of total caspase-3⁺ [$p = 0.016$] and caspase-3⁺CD3⁺ cells [$p = 0.027$] compared with healthy ileum [Figure 7J-L]. Furthermore, a tendency toward higher early and late apoptosis values in both CD3⁺ and CD3⁺CD8⁺ T cells

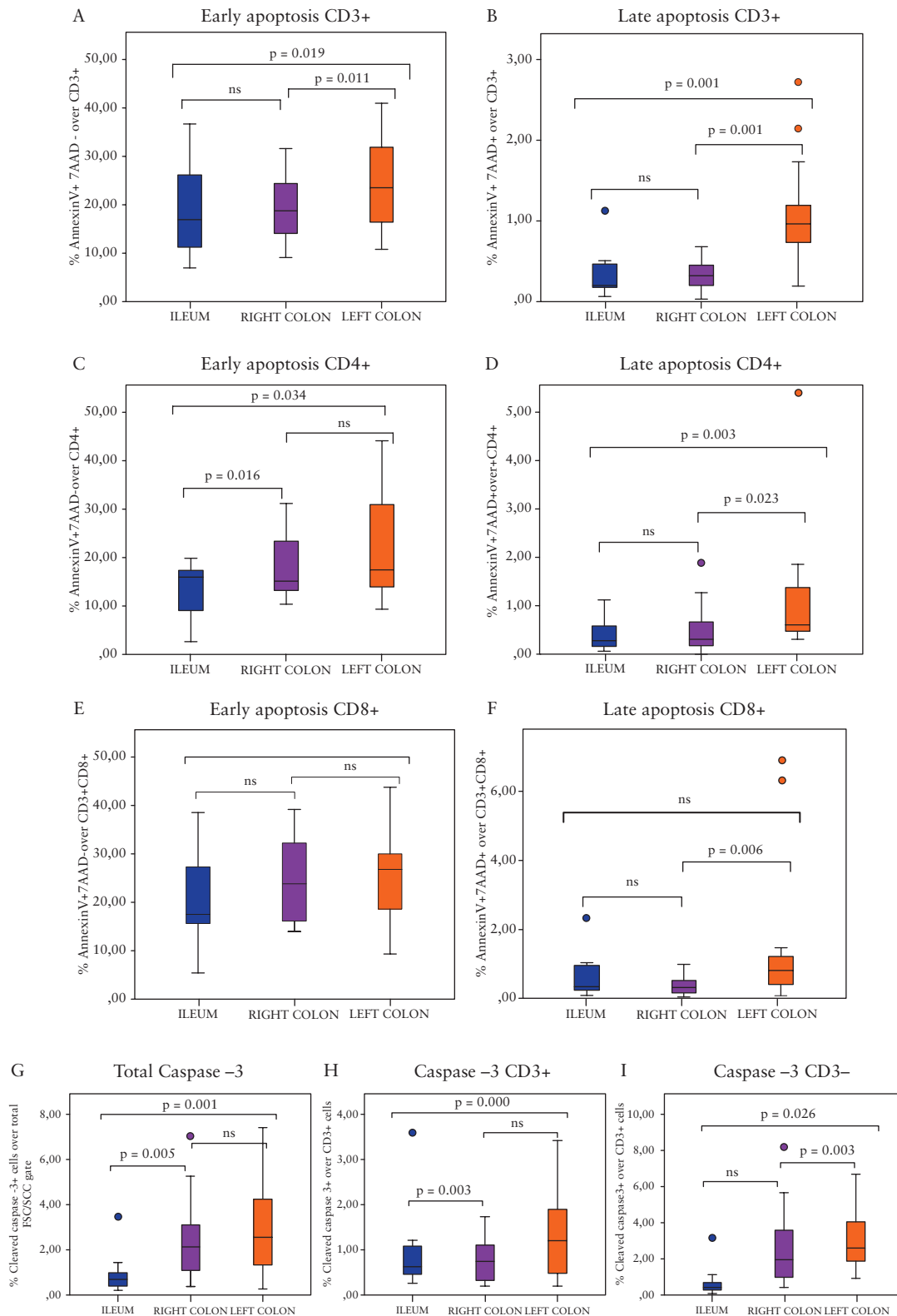


Figure 5. Apoptosis levels in healthy mucosa. Early [AnnexinV⁺/7AAD⁺; A, C, E] and late [AnnexinV⁺/7AAD⁺; B, D, F] apoptosis percentages over CD3⁺T cells [A, B], CD3⁺CD4⁺ [C, D], CD3⁺CD8⁺ [E, F] over paired healthy control samples [$n = 13$]. Percentages of cleaved caspase-3 over lymphocyte gate [G], CD3⁺ cells [H], and CD3⁻ cells [I] in paired healthy control samples [$n = 16$].

compared with healthy ileum was found [Figure 7A-I]. By contrast, all forms of colonic inflammation, including MC, showed a decrease of total caspase3⁺ positive cells and a marked reduction

of late apoptotic CD3⁺ lymphocytes and dead/necrotic CD3⁺ cells [Figure 7A-L]. Though the same trend was observed for the effector CD3⁺CD4⁺ subset, differences were not significant.

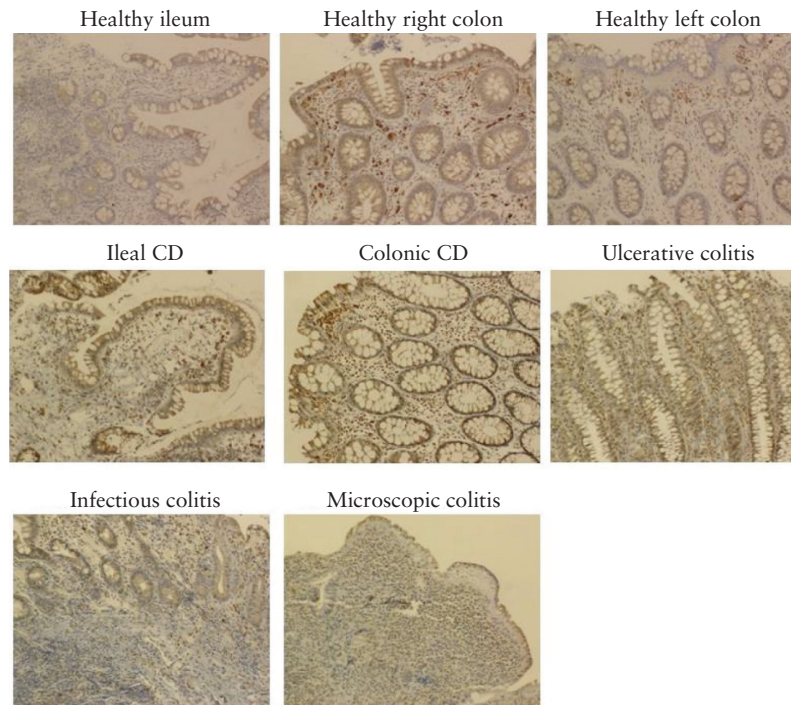


Figure 6. Cleaved caspase-3 immunohistochemical staining. Representative images of paired healthy control mucosa [ileum, right and left colon, $n=8$], ulcerative colitis [$n=7$], infectious colitis [$n=4$], ileal Crohn's disease [$n=9$], right colon Crohn's disease [$n=6$], and left colon Crohn's disease [$n=7$]. Positive control was tonsil. Negative controls were done omitting the primary antibody. Semiquantitative scoring was used with the following scale: 0 = absence of staining; 1 = 1–5 positive cells per field; 2 = 6–20 positive cells per field; and 3 = more than 20 positive cells per field, at a 200x magnification. Immunohistochemistry score: median [percentile 25–75].

A significant increase in the expression of AnnexinV⁺/7AAD⁻ in the CD3⁺CD8⁺ cytotoxic lymphocytes [early apoptosis] was observed in UC and colonic CD. However, there were no differences in AnnexinV⁺/7AAD⁺ CD8⁺ [late apoptosis]. Taking into account that necrotic CD8⁺ T cells are clearly reduced in all IBD groups and that early apoptosis may be a reversible mechanism, we suggest that the final result in terms of CD3⁺CD8⁺ T cell death by apoptosis was not increased in colonic IBD compared with healthy intestine.

All forms of colonic intestinal inflammation, including MC, showed similar behaviour in terms of apoptotic mechanisms. The reduced colonic apoptosis could be, in part, responsible for the increased infiltrate in chronic and acute inflammation that lead to a higher recovery of cells from inflamed samples compared with healthy intestine [Supplementary Figure 5, available as Supplementary data at ECCO-JCC online].

No differences were found in the systemic compartment for any of the apoptotic parameters compared with healthy controls [Supplementary Figure 6, available as Supplementary data at ECCO-JCC online].

4. Discussion

The majority of studies assessing intestinal immune function have overlooked the fact that the intestine has different regions with specific physiological characteristics.¹ Information regarding the immune compartmentalisation in human intestine is scarce. In this study we provide a description of the balance between effector and regulatory mechanisms in different intestinal compartments in healthy and inflamed intestine. We found that Th17, Treg, and DN T cell subsets are increased in the healthy colon compared with the ileum, whereas both effector and tolerogenic mechanisms are

simultaneously increased in the former. In addition, T cell apoptosis increases in a gradual manner distally through the intestine, reaching its highest level in the left colon. This finding, not previously reported, probably represents another anti-inflammatory mechanism to avoid the excessive cell proliferation produced by physiological inflammation in the gut.

Our results assessing Th17 and Treg subsets in the same tissue confirm the existence of a subtle equilibrium between the two populations in the same specific intestinal region,³ which contributes to appropriate intestinal homeostasis. This is probably a consequence of the plasticity of the T cells, driven by specific cytokines such as TGF- β and favouring the proliferation of one cell population or the other depending on the environment requirements.²⁶ The relative increase in both cell populations in the colon compared with the small bowel depends on colonic bacterial content, which is higher in the right colon.²⁷ In fact, Th17 cells are located mainly in barrier surfaces where they protect intestinal mucosa from microorganisms that may penetrate through the epithelium, whereas Treg cells down-regulate the effector T cells by preventing T cell-mediated destruction.²⁸ By contrast, we did not find any regional differences in Th1 cells in healthy intestine, suggesting that this cell type plays a critical role in some chronic inflammatory processes,^{26,29} but not in the intestinal homeostasis of the healthy intestine. In our study, it is confirmed that the increase in Th1 cells is specifically associated with CD and but not with other forms of IBD or acute inflammation [IC].

The majority of compartment-specific differences found in healthy mucosa are lost, except for DP T cells, when comparing different intestinal regions from chronically inflamed intestine. This is due to the important de-regulation found in IBD, which manifests itself in a major cell increment or decrement that overflows normal homeostatic-region differences. Our study showed an increase of

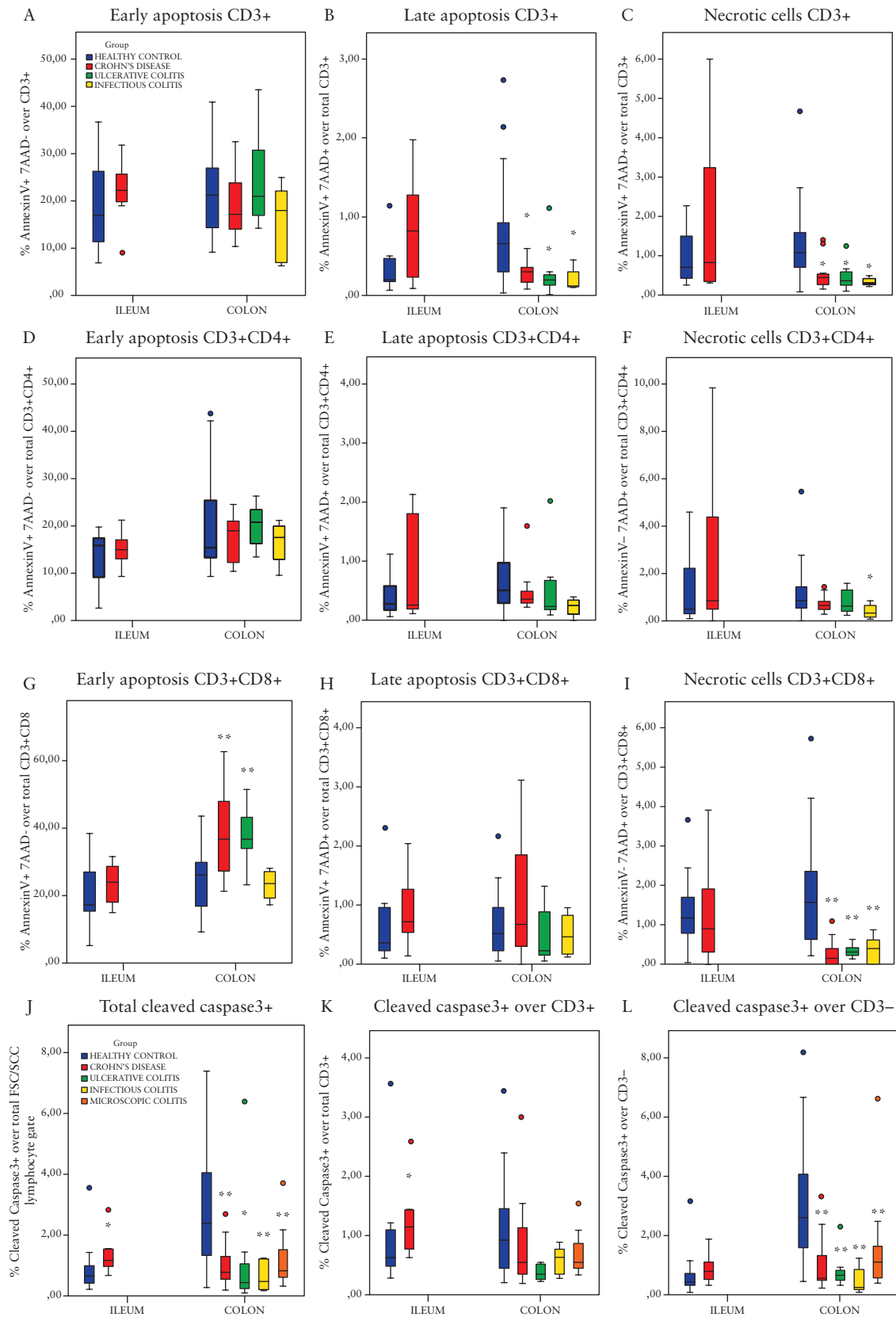


Figure 7. Apoptosis levels in inflamed mucosa. Early [AnnexinV⁺/7AAD⁻; A, D, G], late [AnnexinV⁺/7AAD⁺; B, E, H] apoptosis and necrotic [AnnexinV⁺/7AAD⁺; C, F, I] percentages over CD3⁺T cells [A-C], CD3⁺CD4⁺ [D-F] and CD3⁺CD8⁺ [G-I], and percentages of cleaved caspase-3 over lymphocyte gate [J], CD3⁺ cells [K], and CD3⁻ cells [L] in inflamed samples from ileal healthy mucosa [*n* = 16], ileal Crohn's disease [*n* = 8], healthy colonic mucosa [*n* = 34], colonic Crohn's disease [*n* = 11], ulcerative colitis [*n* = 7], infectious colitis [*n* = 5], and microscopic colitis [*n* = 23] patients; ***p* < 0.005 vs healthy control, **p* < 0.05 vs healthy control.

Th1/Th17 cells in CD and of Th17 cells in UC. No changes were found in IC, whereas a reduction in Th1 and Th17 cells was found in MC. By contrast, a significant increase in mRNA IL-17-A and IFN- γ was found in all forms of chronic and acute intestinal inflammation, showing that the gene expression of a particular cytokine is not an exact mirror of the expansion of a particular CD3⁺CD4⁺T cell subset that is supposed to be its main source. This is important in terms of defining patterns of immune response associated with particular diseases.

It is also noteworthy that both Th1 and Th17 cells were simultaneously either increased [in CD] or decreased [in MC]. This close relationship between the two cell populations could also be the result of CD4⁺ T cell plasticity, allowing a shift of Th17 cells toward Th1 phenotype or a repression of both cell populations. In fact, it is known that Th1 cells can derive from Th17 cells, and it has been demonstrated that Th17 cells in the intestinal mucosa of patients with CD may act like Th1, producing IFN- γ .³⁰ However, to demonstrate this, we should have evaluated additional surface markers of Th17 progenitors in Th1 cells³¹. Unfortunately, this was not technically possible in our study due to the use of a 4-colour cytometer, a limitation for further characterisation of certain cell populations. The same limitation was present when identifying DN T cells. These cells represent a heterogeneous group [MAIT, NKT, $\gamma\delta$ T cells, etc.] that is currently the focus of intense research interest. We detected a significant decrease in DN T cells in colonic CD and an increase in colonic MC, which is exactly symmetrical to that found for Th1/Th17, suggesting that they may have a relevant role in their pathophysiology. In addition, a significant decrease in peripheral DN T cells was found in CD patients, irrespective of disease location. Similar findings were recently found in CD when a specific subgroup of DN T cells [MAIT cells] in peripheral blood was analysed.³² In fact, the DN T cell subset MAIT recognises vitamin metabolites derived from microbiota metabolism³³ and is absent in germ-free mice,³⁴ reinforcing the assumption that its presence is tightly related to the microbial colonic content. It therefore makes sense that its presence is reduced in an environment with a lower bacterial load, such as the ileum. Interestingly, CD and MC, the two intestinal disorders in which DN T cells are altered, are related with a currently known microbial dysbiosis.^{35,36} This disease-specific pattern found for DN T cells, not previously reported, begs for additional phenotyping to explain its role in the pathogenesis of both CD and MC and its relationship with the luminal content.

CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells are involved in maintenance of tolerance, ensuring a balanced immune response. The majority of studies have found increased expression of FOXP3 mRNA and Treg cells in both UC and CD compared with healthy controls.^{37,38,39,40} However, to our knowledge, the status of these Treg cells, their main transcription factor FOXP3, and their protein expression have never been evaluated simultaneously in different types of ileal and colonic IBD and non-IBD inflammation. In the present study we found a significant increase in Treg in all forms of IBD inflammation, but not in the self-limited IC. It is noteworthy that the majority of IBD patients included in this study, in contrast to previous studies, had a recent diagnosis of the disease [early disease] and none of them was receiving immunosuppressants at the time of inclusion. This suggests that the expansion of this cell type occurs spontaneously in IBD, though it had been described as being induced by anti-TNF therapy.^{41,42} The simultaneous increase of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ cells, mRNA, and protein FOXP3 expression show that this cell type plays a strong and permanent key regulatory

role in all forms of IBD, probably counterbalancing the function of Th1/Th17 effector cells.⁷

Resistance to T cell apoptosis is an important pathogenic mechanism in the perpetuation of chronic inflammation,^{8,9,10} particularly in CD, which is considered part of the category of diseases with defective T cell apoptosis.⁴³ Previous studies assessing T cell apoptosis in CD did not take into account the location of the samples obtained when comparing apoptotic mechanisms in CD mucosa with those from healthy intestine.⁴⁴ In the present study, we noted location-specific changes in the apoptotic mechanisms in both healthy and inflamed intestine. In fact, early and late T cell apoptosis rates are reduced in all forms of colonic inflammation, but not in ileal CD. Since apoptosis measurement has been suggested as a good biomarker for predicting treatment response,^{45,46,47} differences in lymphocyte apoptosis between ileal and colonic inflammation, particularly in CD, are of special importance and should be taken into account.

In contrast to other studies that found changes in peripheral blood in the effector Th1/Th17^{19,48} or regulatory cell populations,^{42,49} we did not find differences compared with controls, except for DN T cells in CD. These differences between studies are probably due to the types of populations included, highlighting the importance of case selection and adequate definition. In this sense, it was previously demonstrated that increased circulating Th17 cells are detected in late but not early CD patients¹⁹ and that decreased Th1 cells are found in paediatric but not in adult CD.⁴⁸ Therefore, the location-specific differences we found in the present study may be due either to differential recruitment and/or to differential specialisation from pre-existing mucosal precursors. Functional assays should be performed to evaluate this issue.

In summary, our study demonstrates that some but not all the location-specific differences in the lymphocyte profile found in healthy mucosa are lost in inflammatory conditions. In addition, regional differences in lymphocyte apoptosis were found in both healthy mucosa and the intestinal mucosa of CD. Our results reinforce the need for considering immunological regional differences when assessing the pathophysiology of intestinal inflammation.

Funding

This study was supported by research grants from the Spanish government [BFU-2007-64887 and BFU-2010-19888] and a GETTECCU-OTSUKA grant.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

We thank Dr David Bernardo for his valuable comments during the manuscript preparation. We thank Manel González Roldán, M^a Ángels Sánchez Visiedo, and Natalia Cardozo for their helpful technical assistance. The authors thank the nursing team of Nuria Rubies, Maite Roldán, Olga Benítez, Anabel Polo, Rosa Tomás, Tania Montoll, Anna Agustí, and Juana M^a Hernández for their valuable assistance in sample collection.

Author Contributions

AC designed and performed all the laboratory experiments, performed statistical analysis, prepared figures, and drafted the manuscript. FFB, CL, MR, MA, XA, MF, YZ, and ME recruited patients and did biopsy collection. EP designed and contributed to qPCR experiments. AS contributed to

immunohistochemistry experiments and established scores. ME conceived and designed the study, revised, edited and finalised the manuscript, coordinated the research group, and directed the execution of the study. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Supplementary Data

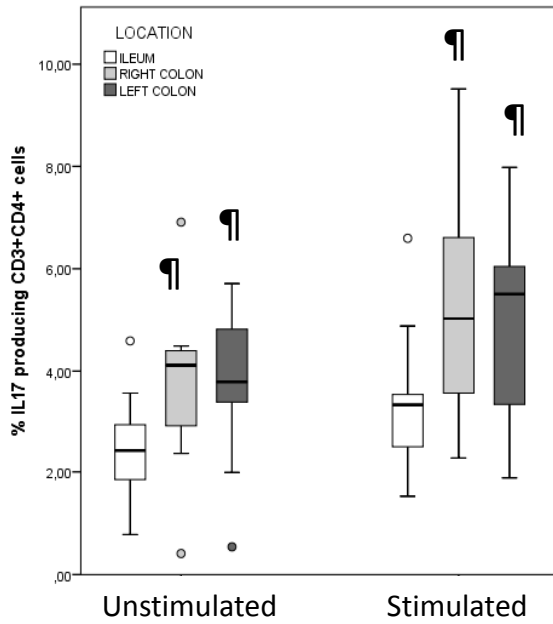
Supplementary data are available at *ECCO-JCC* online.

References

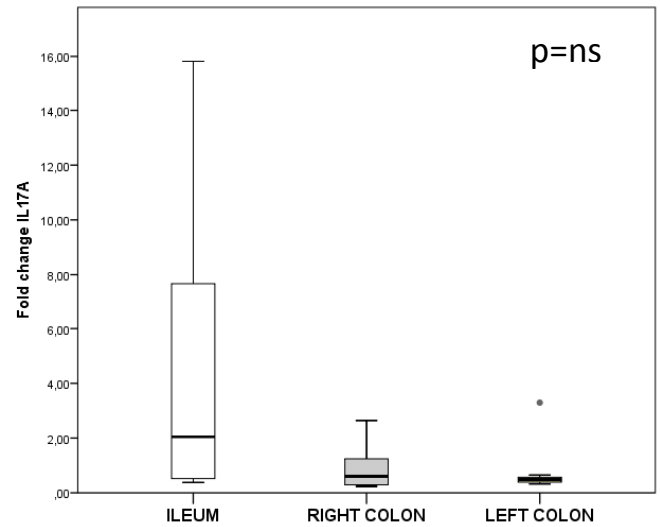
- Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol* 2014;14:667–85.
- Junker Y, Bode H, Wahnschaffe U, et al. Comparative analysis of mononuclear cells isolated from mucosal lymphoid follicles of the human ileum and colon. *Clin Exp Immunol* 2009;156:232–7.
- Wolff MJ, Leung JM, Davenport M, Poles MA, Cho I, Loke P. TH17, TH22 and Treg cells are enriched in the healthy human cecum. *PLoS One* 2012;7:e41373.
- Tauschmann M, Priel B, Treiber G, et al. Distribution of CD4[+] , CD8[+] - and regulatory T cells in the upper and lower gastrointestinal tract in healthy young subjects. *PLoS One* 2013;8:e80362.
- Mann ER, Bernardo D, English NR, et al. Compartment-specific immunity in the human gut: properties and functions of dendritic cells in the colon versus the ileum. *Gut* 2016;75:256–70.
- Brucklacher-Waldert V, Carr EJ, Linterman MA, Veldhoen M. Cellular plasticity of CD4+ T cells in the intestine. *Front Immunol* 2014;5:488.
- Kelsen J, Agnholt J, Hoffmann HJ, Rømer JL, Hvas CL, Dahlerup JF. FoxP3[+]CD4[+]CD25[+] T cells with regulatory properties can be cultured from colonic mucosa of patients with Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 2005;141:549–57.
- Bu P, Keshavarzian A, Stone DD, et al. Apoptosis: one of the mechanisms that maintains unresponsiveness of the intestinal mucosal immune system. *J Immunol* 2001;166:6399–403.
- Boirivant M, Marini M, Di Felice G, et al. Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis. *Gastroenterology* 1999;116:557–65.
- Doering J, Begue B, Lentze MJ, et al. Induction of T lymphocyte apoptosis by sulphasalazine in patients with Crohn's disease. *Gut* 2004;53:1632–8.
- Van Assche G, Dignass A, Panes J, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis* 2010;4:7–27.
- Dignass A, Eliakim R, Magro F, et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis* 2012;6:965–90.
- Munch A, Aust D, Bohr J, et al. Microscopic colitis: Current status, present and future challenges: statements of the European Microscopic Colitis Group. *J Crohns Colitis* 2012;6:932–45.
- Best WR, Becktel JM, Singleton JW, Kern F Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1976;70:439–44.
- Daperno M, D'Haens G, Van Assche G, et al. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc* 2004;6:505–12.
- Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med* 1987;317:1625–9.
- Carrasco A, Mañé J, Santaolalla R, et al. Comparison of lymphocyte isolation methods for endoscopic biopsy specimens from the colonic mucosa. *J Immunol Methods* 2013;389:29–37.
- Santaolalla R, Mañé J, Pedrosa E, et al. Apoptosis resistance of mucosal lymphocytes and IL-10 deficiency in patients with steroid-refractory Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:1490–500.
- Veny M, Esteller M, Ricart E, Pique JM, Panes J, Salas A. Late Crohn's disease patients present an increase in peripheral Th17 cells and cytokine production compared with early patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;31:561–72.
- Dussault AA, Pouliot M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. *Biol Proced Online* 2006;8:1–10.
- Verdier J, Begue B, Cerf-Bensussan N, Ruemmele FM. Compartmentalized expression of Th1 and Th17 cytokines in pediatric inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2012;18:1260–6.
- Bogaert S, Laukens D, Peeters H, et al. Differential mucosal expression of Th17-related genes between the inflamed colon and ileum of patients with inflammatory bowel disease. *BMC Immunol* 2010;11:61.
- Pinchuk IV, Beswick EJ, Saada JI, et al. Human colonic myofibroblasts promote expansion of CD4+ CD25high Foxp3+ regulatory T cells. *Gastroenterology* 2011;140:2019–30.
- Ai TL, Solomon BD, Hsieh CS. T-cell selection and intestinal homeostasis. *Immunol Rev* 2014;259:60–74.
- Wu H, Che X, Zheng Q, Wu A, et al. Caspases: a molecular switch node in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *Int J Biol Sci* 2014;10:1072–83.
- Garrido-Mesa N, Algieri F, Rodriguez Nogales A, Galvez J. Functional plasticity of Th17 cells: implications in gastrointestinal tract function. *Int Rev Immunol* 2013;32:493–510.
- Gaboriau-Routhiau V, Rakotobe S, Lecuyer E, et al. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity* 2009;31:677–89.
- Betelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441:235–8.
- Niessner M, Volk BA. Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction [RT-PCR]. *Clin Exp Immunol* 1995;101:428–35.
- Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 2007;204:1849–61.
- Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 2007;8:639–46.
- Serriari NE, Eoche M, Lamotte L, et al. Innate mucosal-associated invariant T [MAIT] cells are activated in inflammatory bowel diseases. *Clin Exp Immunol* 2014;176:266–74.
- Kjer-Nielsen L, Patel O, Corbett AJ, et al. MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature* 2012;491:717–23.
- Treiner E, Duban L, Bahram S, et al. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature* 2003;422:164–9.
- Fischer H, Holst E, Karlsson F, et al. Altered microbiota in microscopic colitis. *Gut* 2015;64:1185–6.
- Hold GL, Smith M, Grange C, Watt ER, El-Omar EM, Mukhopadhyay I. Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: what have we learnt in the past 10 years? *World J Gastroenterol* 2014;20:1192–210.
- Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, et al. Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25[high] T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2005;128:1868–78.
- Holmén N, Lundgren A, Lundin S, et al. Functional CD4+CD25high regulatory T cells are enriched in the colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and increase with disease activity. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:447–56.
- Wang Y, Liu XP, Zhao ZB, Chen JH, Yu CG. Expression of CD4+ forkhead box P3 [FOXP3]+ regulatory T cells in inflammatory bowel disease. *J Dig Dis* 2011;12:286–94.
- Reikvam DH, Perminow G, Lyckander LG, et al. Increase of regulatory T cells in ileal mucosa of untreated pediatric Crohn's disease patients. *Scand J Gastroenterol* 2011;46:550–60.
- Boschetti G, Nancey S, Sardi F, Roblin X, Flourie B, Kaiserlian D. Therapy with anti-TNF α antibody enhances number and function of Foxp3[+] regulatory T cells in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:160–70.
- Li Z, Arijis I, De Hertogh G, et al. Reciprocal changes of Foxp3 expression in blood and intestinal mucosa in IBD patients responding to infliximab. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:1299–310.
- Sturm A, Fiocchi C. Life and death in the gut: more killing, less Crohn's. *Gut* 2002;50:148–9.
- Itoh J, de La Motte C, Strong SA, Levine AD, Fiocchi C. Decreased Bax expression by mucosal T cells favours resistance to apoptosis in Crohn's disease. *Gut* 2001;49:35–41.

45. Cossu A, Biancone L, Ascolani M, Pallone F, Boirivant M. "In vitro" azathioprine-induced changes in peripheral T cell apoptosis and IFN-gamma production associate with drug response in patients with Crohn's disease. *J Crohns Colitis* 2013;7:441–50.
46. Van den Brande JM, Koehler TC, Zelinkova Z, *et al.* Prediction of antitumour necrosis factor clinical efficacy by real-time visualisation of apoptosis in patients with Crohn's disease. *Gut* 2007;56:509–17.
47. Hlavaty T, Ferrante M, Henckaerts L, Pierik M, Rutgeerts P, Vermeire S. Predictive model for the outcome of infliximab therapy in Crohn's disease based on apoptotic pharmacogenetic index and clinical predictors. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:372–9.
48. Holland N, Dong J, Garnett E, *et al.* Reduced intracellular T-helper 1 interferon-gamma in blood of newly diagnosed children with Crohn's disease and age-related changes in Th1/Th2 cytokine profiles. *Pediatr Res* 2008;63:257–62.
49. Hvas CL, Kelsen J, Agnholt J, Dige A, Christensen LA, Dahlerup JF. Discrete changes in circulating regulatory T cells during infliximab treatment of Crohn's disease. *Autoimmunity* 2010;4:325–33.

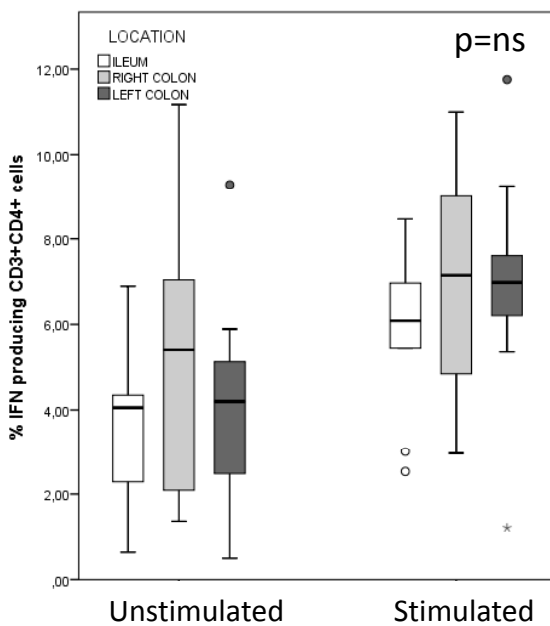
A % Th17 cells in healthy mucosa



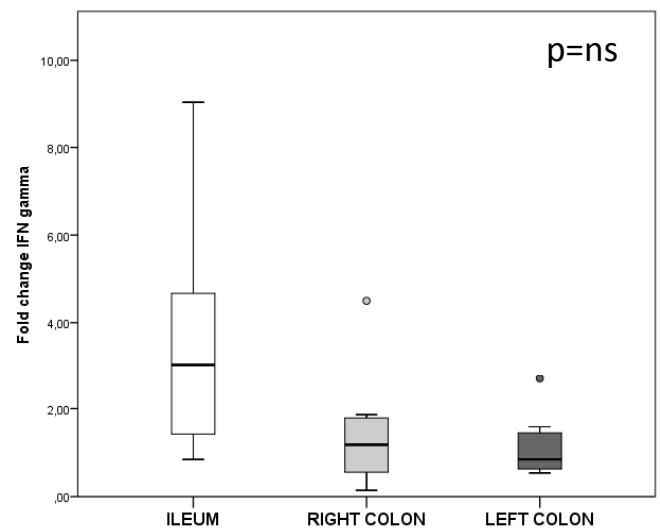
B IL-17-A gene expression in healthy mucosa



C % Th1 cells in healthy mucosa



D IFN- γ gene expression in healthy mucosa

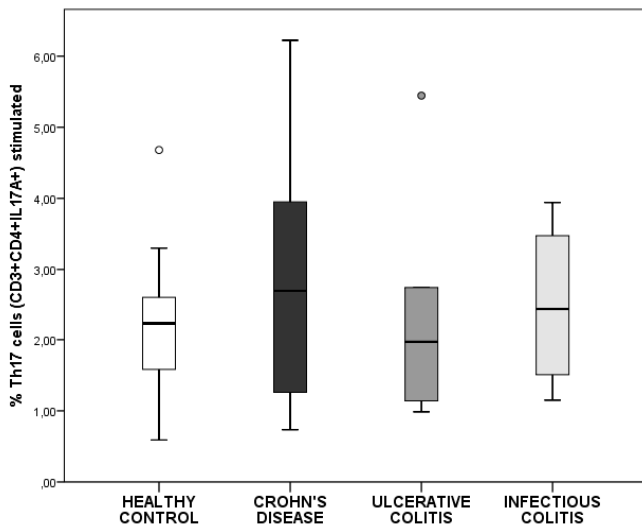


SUPPLEMENTARY FIGURE 1.

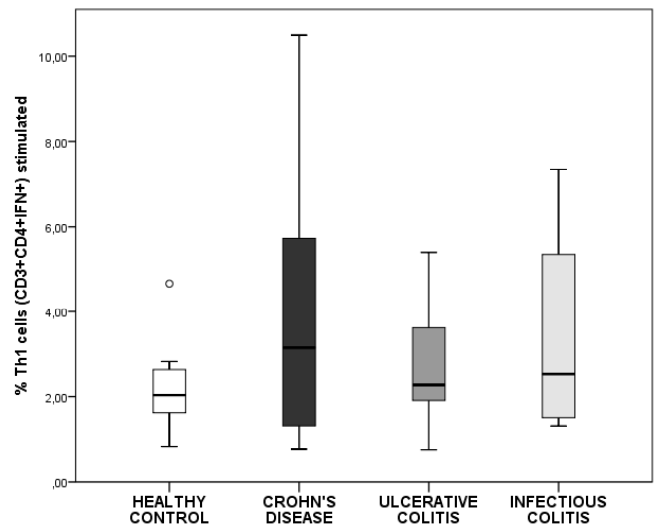
Percentages of Th17 cells (A) and Th1 cells (C) in paired intestine regions from healthy controls (n=10). IL-17-A (B) and IFN- γ (D) gene expression from healthy controls (n=8) ¶p<0.05 vs healthy ileum

Supplementary Material (S2): Percentages of T cell subsets in PBMC

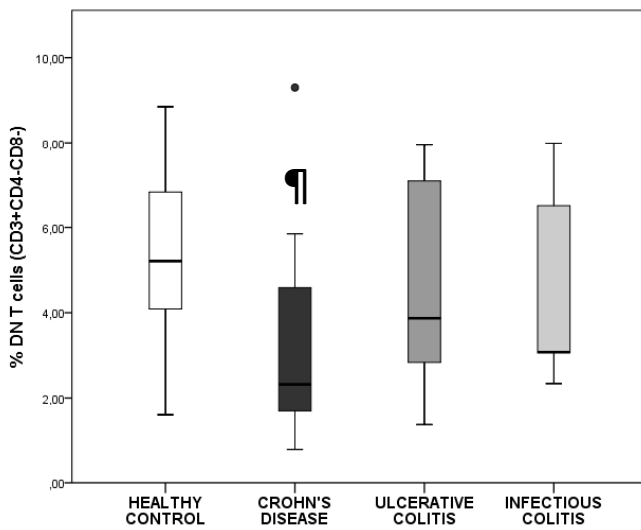
A) Th17 cells (CD3+CD4+IL17+)



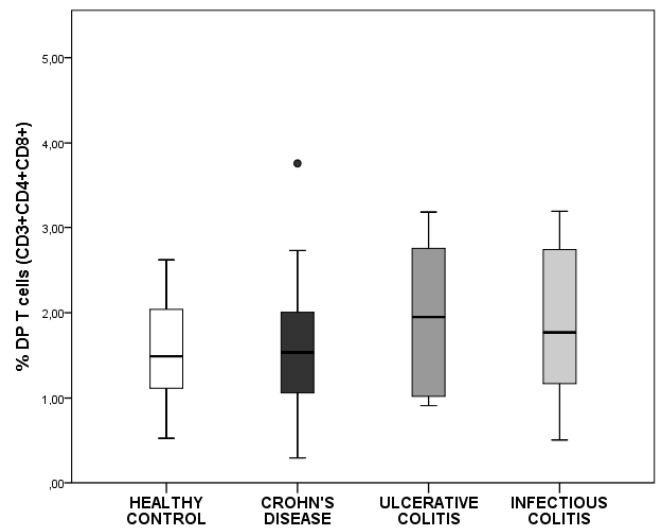
B) Th1 cells (CD3+CD4+IFN γ)



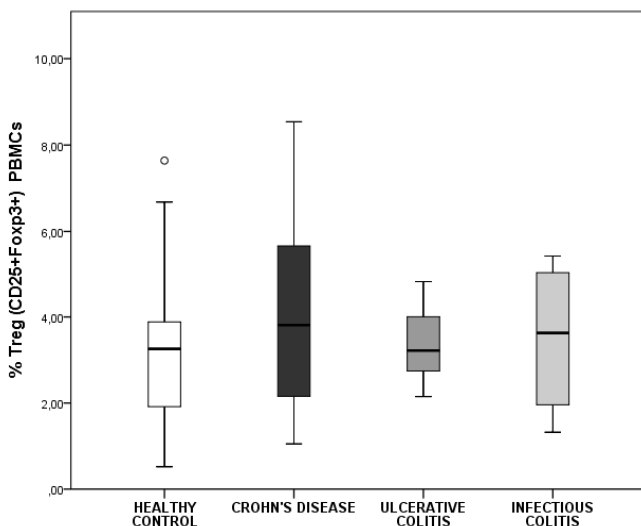
C) DN T cells (CD3+CD4-CD8-)



D) DP T cells (CD3+CD4+CD8+)

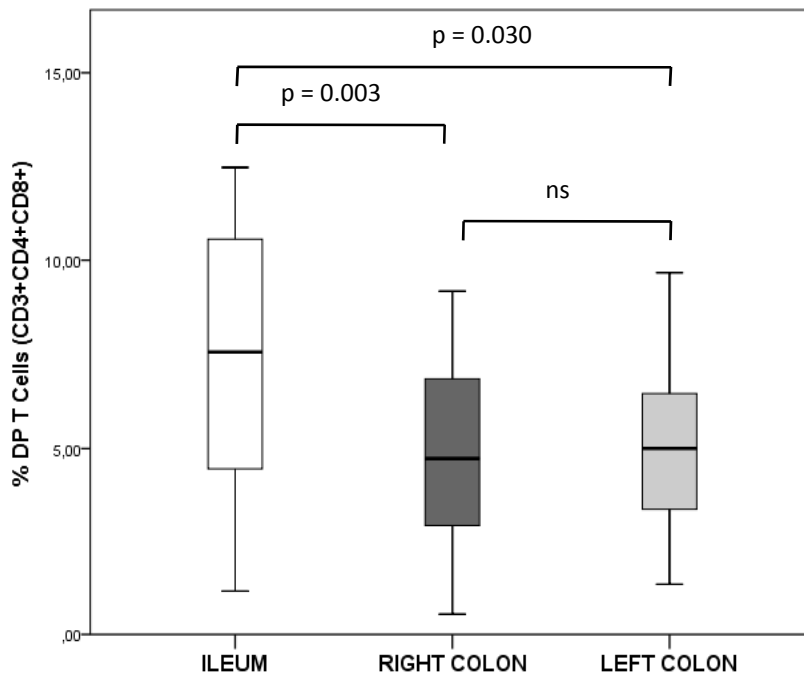


E) Treg (CD4+CD25+FOXP3+)

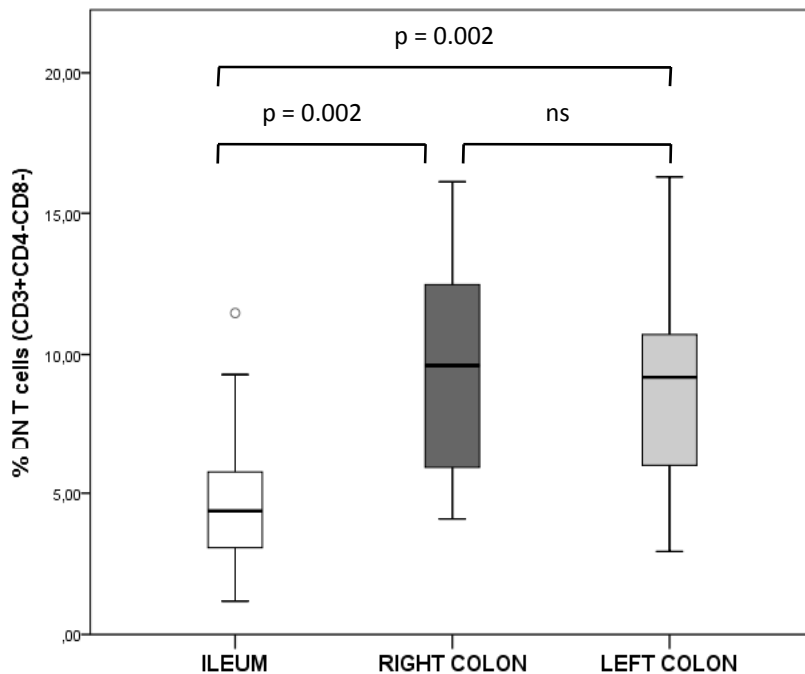


SUPPLEMENTARY FIGURE 2. Percentages of A) Th1, B) Th17, C) DP T cells, D) DN T cells, and E) Treg cells in peripheral blood mononuclear cells of healthy controls, Crohn's disease, ulcerative colitis, and infectious colitis patients. ¶p < 0.05 vs healthy control

A) % DP T CELLS IN HEALTHY MUCOSA



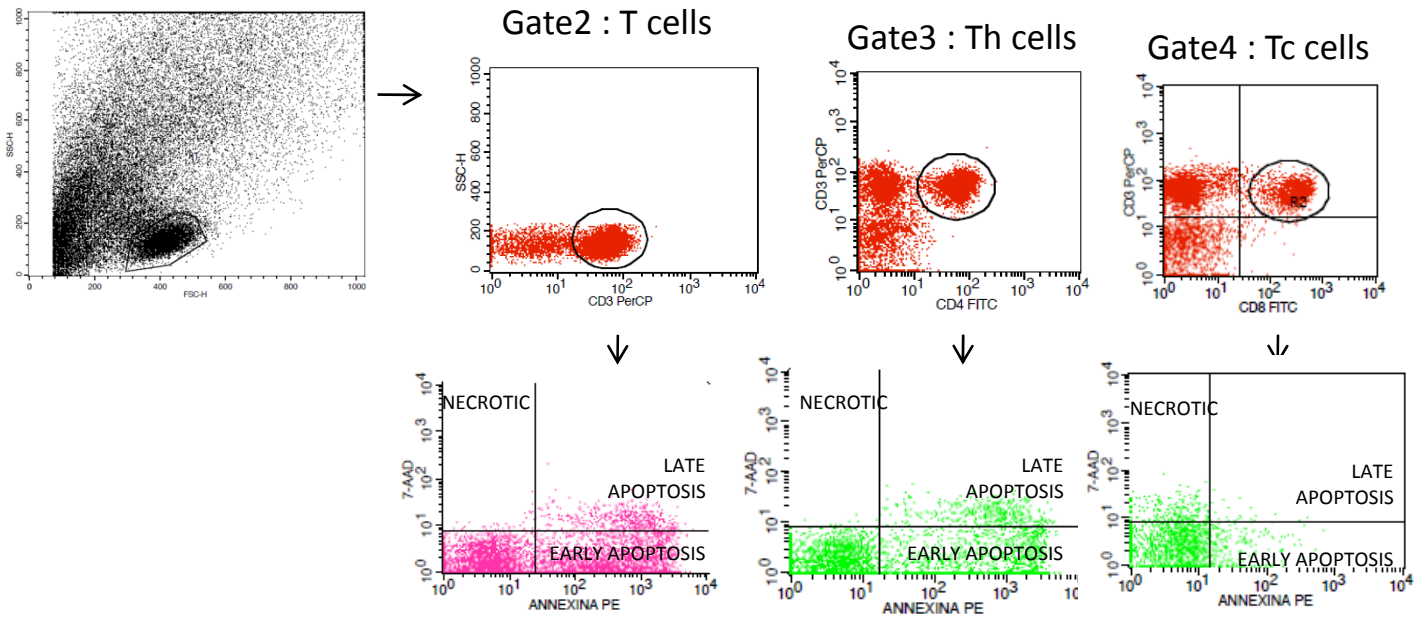
B) % DN T CELLS IN HEALTHY MUCOSA



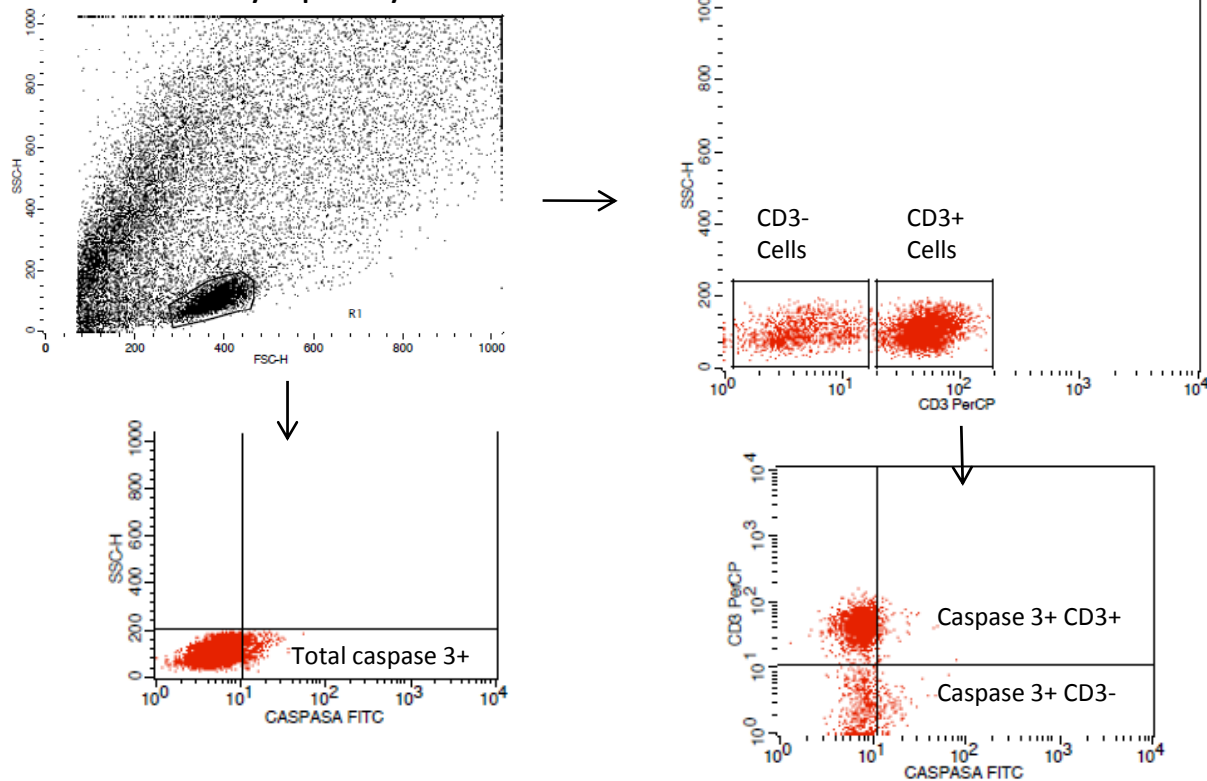
SUPPLEMENTARY FIGURE 3. Percentages of double positive (DP) T cells (A) and double negative (DN) T cells (B) in paired intestine regions from healthy controls (n=16).

A

Gate1 : Lymphocytes

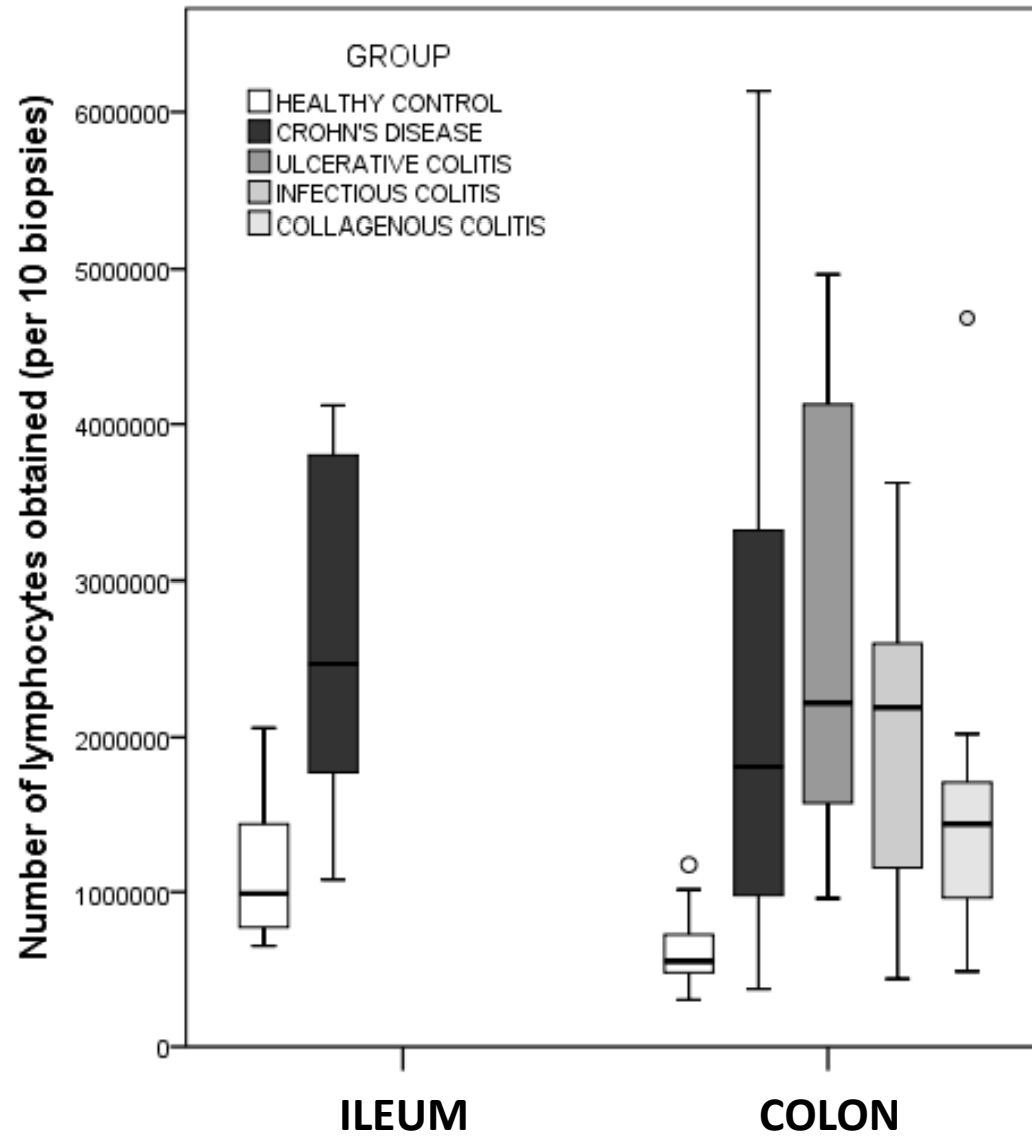
**B**

Gate1 : Lymphocytes



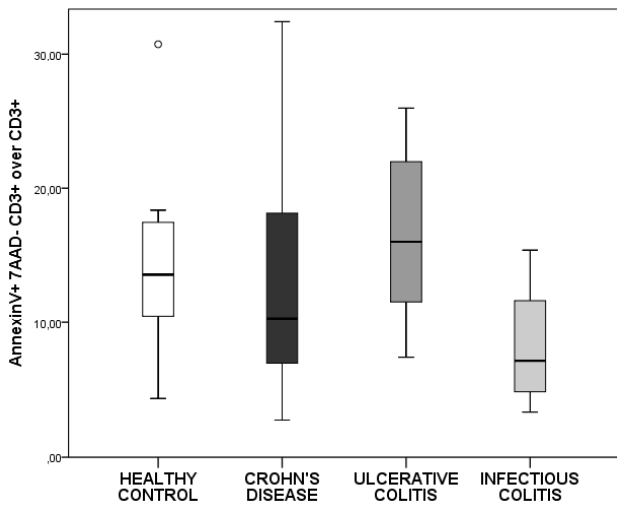
Supplementary figure 4. Two complementary techniques were used to detect lymphocyte apoptosis. A) Representative gating strategy for apoptosis measurement. AnnexinV/7AAD was measured over CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ gates. AnnexinV⁺/7AAD⁻ cells were considered as early apoptotic, whereas AnnexinV⁺/7AAD⁺ cells were considered late apoptotic. AnnexinV⁻/7AAD⁺ were considered dead/necrotic cells. B) Representative gating strategy for intracellular cleaved caspase-3 measurement. Cleaved caspase-3 was measured over total low-SSC lymphocyte gate and over CD3⁺ and CD3⁻ gates. Images are representative of healthy left colon samples.

Supplementary figure 5. Number of isolated lymphocytes from 10 biopsies. Recovery is higher in inflamed samples (including MC) compared with healthy intestine.

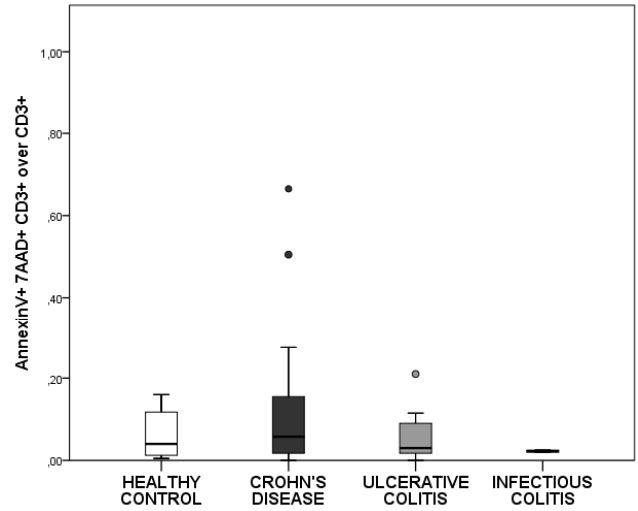


Supplementary figure 6 : Apoptosis of T cell subsets in PBMC

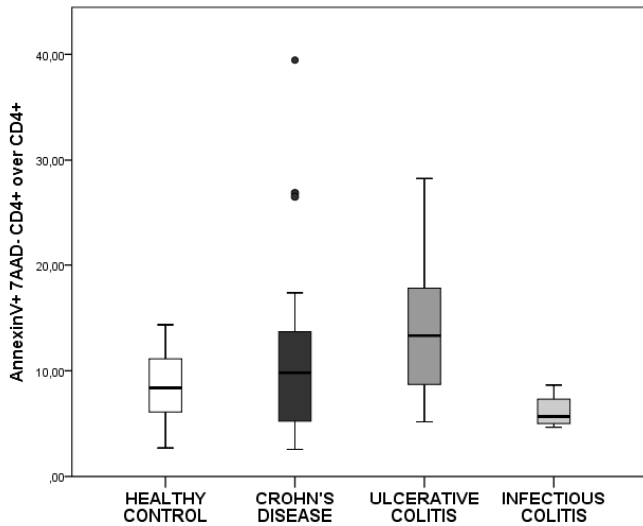
A) Early apoptosis CD3+



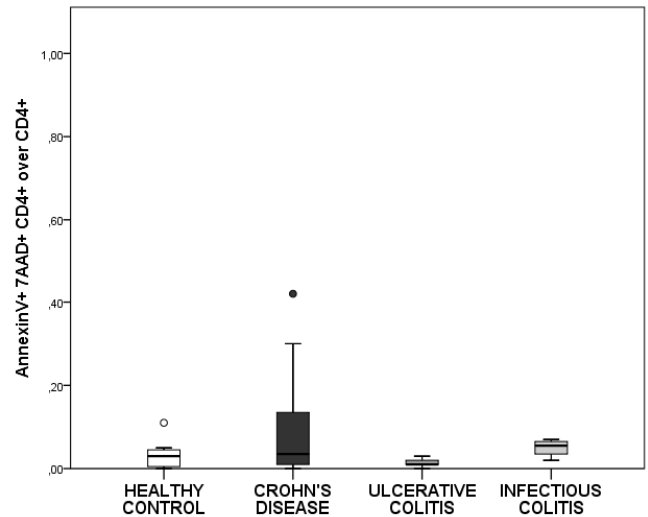
B) Late apoptosis CD3+



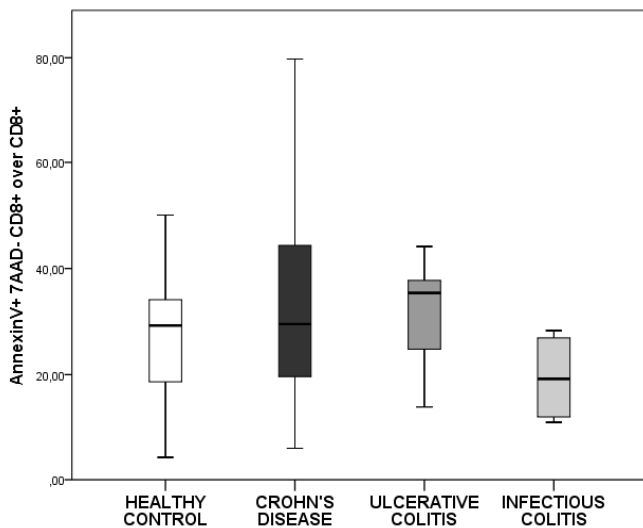
C) Early apoptosis CD4+



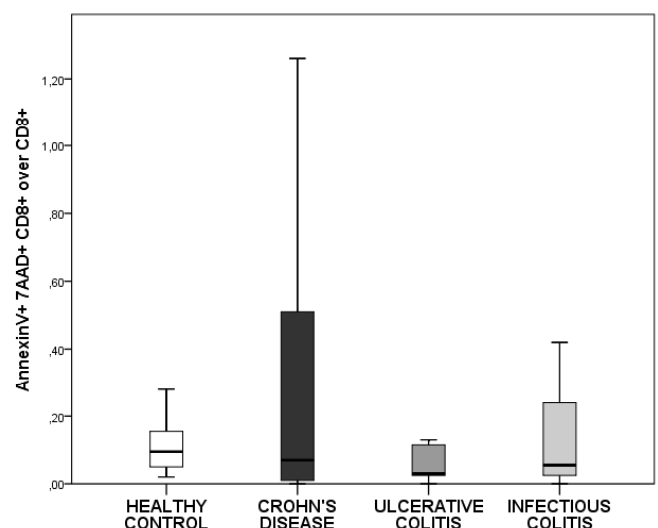
D) Late apoptosis CD4+



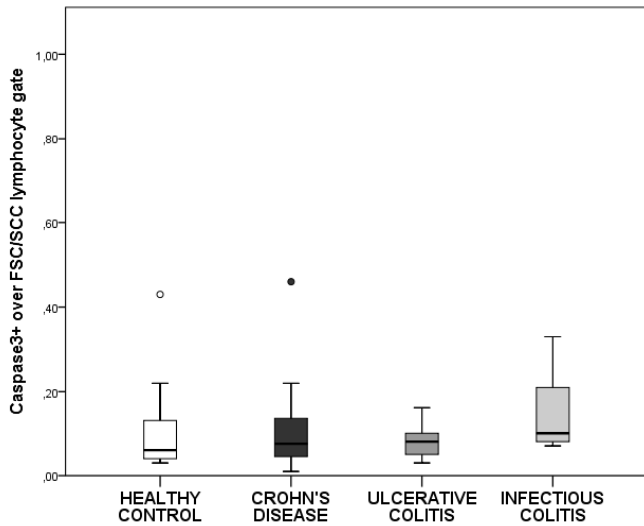
E) Early apoptosis CD8+



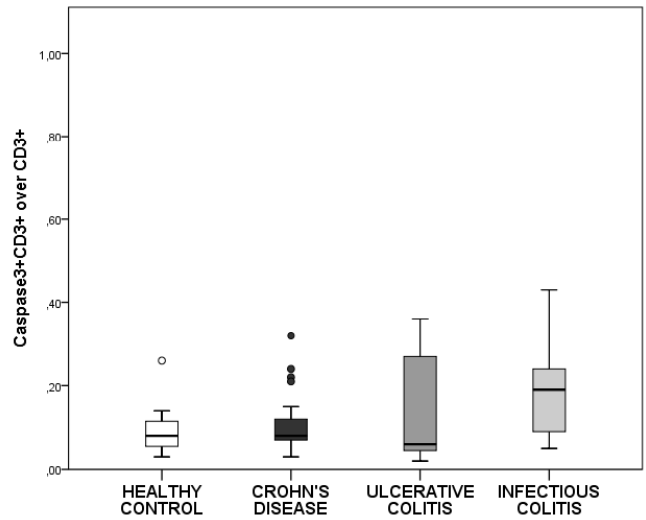
F) Late apoptosis CD8+



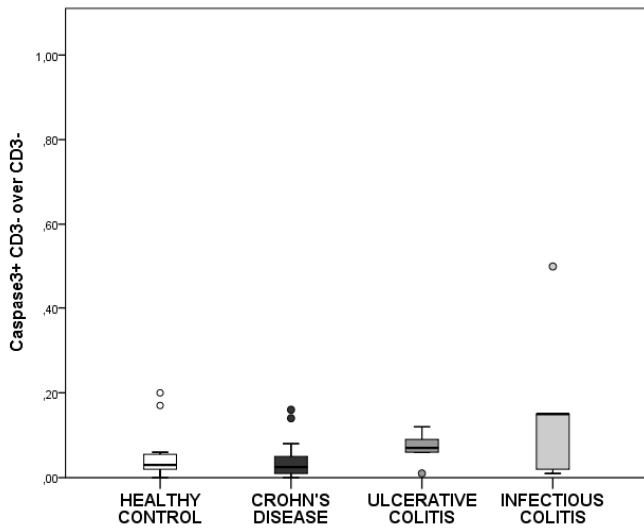
G) Caspase3+ over lymphocytes



H) Caspase3+ over CD3+



I) Caspase3+ over CD3-



Supplementary figure 6. Percentages of early, late, and caspase-3 apoptosis levels over peripheral blood mononuclear cells in healthy controls, Crohn's disease, ulcerative colitis, and infectious colitis patients.

ESTUDI 2:

El sistema immunitari de la mucosa de la colitis microscòpica: similituds i diferències entre la colitis col·làgena i la colitis limfocítica.

Resum

Introducció: La colitis col·làgena (CC) i la colitis limfocítica (CL) són les dues formes de presentació principals de la colitis microscòpica (CM). L'objectiu de l'estudi va ser identificar les similituds i diferències de la seva resposta immunitària de la mucosa.

Mètodes: Es van analitzar biòpsies de colon de 15 CC, 8 LC i 10 controls sans. Es van mesurar els limfòcits mitjançant citometria de flux, l'expressió gènica per PCR en temps real i els nivells de proteïnes per ELISA.

Resultats: Els pacients amb CL van presentar un percentatge inferior de limfòcits CD4⁺ i DP (CD4⁺CD8⁺), i superior de limfòcits CD8⁺ i CD4⁺TCRγδ⁺ en comparació amb CC i controls sans. Les cèl·lules Treg i DN es van trobar incrementades tan a CC com a CL en comparació amb controls, juntament amb un increment de la citocina antiinflamatòria IL-10 (a nivell RNA i proteïna). Contràriament, els nivells de Th1 i Th17 es van trobar significativament reduïts a CC i CL en vers controls, malgrat que els nivells d'RNA de citocines relacionades amb aquestes vies es va trobar incrementat a les dues malalties.

Conclusions: La CC i la CL comparteixen alguns mecanismes efectors i reguladors del sistema immunitari, però no tots. Els nivells elevats d'IL-10 i cèl·lules Treg i DN presents a CC i CL podrien ser en part responsables de la manca de progressió del dany estructural i del bloqueig de la producció de citocines proinflamatòries. Malgrat això, el perfil de limfòcits de mucosa de CC i CL és molt diferent, el que podria ser conseqüència de diferents antígens desencadenants de la

malaltia a cadascuna. Per tant, la CC i la CL són dues malalties intestinals molt estretament relacionades però independents.

Original Article

Immunological Differences between Lymphocytic and Collagenous Colitis

Anna Carrasco^{a,b}, Maria Esteve^{a,b}, Antonio Salas^{b,c}, Elisabet Pedrosa^a,
Mercè Rosinach^{a,b}, Montserrat Aceituno^{a,b}, Yamile Zabana^{a,b},
Fernando Fernández-Bañares^{a,b}

^aDepartment of Gastroenterology, Hospital Universitari Mútua Terrassa, Fundació Recerca Mútua Terrassa, Terrassa, Barcelona, Spain ^bCentro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Terrassa, Barcelona, Spain ^cDepartment of Pathology, Hospital Universitari Mútua Terrassa, Terrassa, Barcelona, Spain

Corresponding author: Fernando Fernández-Bañares, MD PhD, Department of Gastroenterology, Hospital Universitari Mútua Terrassa, University of Barcelona, Plaza Dr Robert 5, 08221 Terrassa, Barcelona, Spain. Tel: 34-937-365050; Fax: 34-937-365043; Email: ffbanares@mutuaterrassa.es

Abstract

Background: Lymphocytic (LC) and collagenous (CC) colitis are the two major forms of microscopic colitis (MC). The aim of this study was to identify similarities and differences in their mucosal immune characteristics.

Methods: Colonic biopsies from 15 CC, 8 LC, and 10 healthy controls were collected. Mucosal lymphocytes were assessed by flow cytometry. Tissue gene expression and protein levels were determined by real-time PCR and ELISA, respectively.

Results: LC patients had lower numbers of CD4⁺ and double-positive CD4⁺CD8⁺ mucosal T lymphocytes, and higher numbers of CD8⁺ and CD4⁺TCR $\gamma\delta$ ⁺ mucosal T cells, compared with controls and CC patients. Regulatory Treg (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) and double-negative (CD3⁺CD4⁻CD8⁻) T cell percentages were higher in both CC and LC compared with controls, coupled with higher levels of the anti-inflammatory IL-10, both at mRNA and protein levels. By contrast, Th1 and Th17 cells were lower in both CC and LC, although gene expression of Th1/Th17 cytokines was higher in both.

Conclusion: CC and LC share some regulatory and effector mechanisms, but not others. Higher IL-10 levels and higher Treg and double-negative T cell percentages, found in both CC and LC, could be responsible for the lack of progression of structural damage and the blockade of proinflammatory cytokine production. However, CC and LC are revealed as separate, independent entities, as they show clearly different mucosal lymphocyte profiles, which could be caused by different luminal triggers of the two diseases. Hence, CC and LC are two closely related but independent intestinal disorders.

Key Words: Collagenous colitis; lymphocytic colitis; Th1/Th17; IL-10; double-negative T cells

1. Introduction

Microscopic colitis (MC), a common cause of non-bloody watery diarrhoea, is comprised of two main forms: collagenous colitis (CC) and lymphocytic colitis (LC). Although very little is known about their aetiology and pathogenesis, current evidence suggests that

luminal agents may induce the development of CC.¹ Clinical and histological improvement after faecal stream diversion supports this hypothesis.²

It is still a matter of debate whether CC and LC are independent entities or rather two subtypes of the same disease.^{3,4} Cytokine

disturbances, such as increases in IFN- γ , IL-17-A, IL-21, IL-22, IL-6, and IL-15, are described in both CC and LC,^{5,6} without significant differences between them. Increase in T regulatory lymphocytes (Treg) is also observed in both MC subtypes,⁷ although their numbers are slightly higher in LC.^{7,8} However, histological differences between CC and LC are evident, and extracellular matrix remodelling elements are differentially expressed,⁹ suggesting that the two entities are similar in some immunological pathways but different in others.

Therefore, the aim of the study was to characterize the mucosal immune profile of both CC and LC. To that end, we analysed their colonic lymphocytic profiles (effector and regulatory T cells) by flow cytometry, and their related cytokine patterns by real-time PCR and enzyme-linked immunosorbent assay in CC, LC, and healthy control (HC) biopsies. Our results revealed differences in the cytokine milieu and in the intestinal lymphocyte profile in these patients, suggesting that the two entities are mediated by different immunological mechanisms.

2. Material and Methods

2.1. Patients

We enrolled 27 clinically active (≥ 3 watery stools per day) consecutive MC patients who were not receiving any medication for MC at the time of colonoscopy. Fifteen patients had CC and 8 had LC. After informed consent, colonic biopsies were obtained from a new sigmoidoscopy. Four patients were excluded from the study as they presented normal histology at the time of sample-taking, despite a recent previous diagnosis of MC (initially, 3 CC and 1 LC). As a control group, 10 healthy subjects who underwent colonoscopy for colorectal cancer screening were included. Healthy subjects had no endoscopic or microscopic abnormalities. Demographic features and clinical characteristics of patients and controls are shown in Table 1. All included patients and controls had negative celiac serology (anti-tissue transglutaminase IgA antibodies).

Colonic biopsy samples were obtained from the sigma-descendent colon using large-capacity biopsy forceps (Radial Jaw 4, Boston Scientific, USA). All patients and controls provided written, informed consent. This study was approved by the ethical committee of Hospital Universitari Mútua de Terrassa.

2.2. Microscopic colitis diagnosis

The diagnosis of both CC and LC was based on both clinical and histopathological criteria, as described elsewhere.^{1,7,10} The clinical

criteria were chronic watery diarrhoea of at least 1 month duration and a grossly normal appearance of colonic mucosa on colonoscopy. The histological criteria were (i) increased chronic inflammatory infiltrate (plasma cells and lymphocytes) in the lamina propria, (ii) increased number of intraepithelial lymphocytes (IELs) (normal ≤ 7 IELs per 100 epithelial cells), and (iii) damage to surface epithelium, with flattening of epithelial cells and/or epithelial loss and detachment, and minimal crypt architecture distortion. Histological diagnosis of CC required the additional presence of an abnormal surface subepithelial collagen layer with a thickness ≥ 10 μm , which entraps superficial capillaries and has an irregular lacy appearance of its lower edge. More than 20 IELs per 100 epithelial cells in the absence of a thickened subepithelial collagen layer was necessary to diagnose LC.

2.3. Mucosal lymphocyte isolation

Ten colonic biopsies from the sigma-descendent colon were processed with a smooth enzymatic method as previously described.^{11,12} In a previous study, we analysed various methods of separating mucosal epithelium from lamina propria compartments, demonstrating that none of the methods achieves proper separation and that they also induced a significant cell loss.¹¹ Thus, we used the whole sample biopsy for lymphocyte isolation purposes. Briefly, biopsies were collected in culture media and immediately processed with 1 mM DTT and 1 mM EDTA (25 min, moderate shaking) for mucus clearance, and then cultured overnight on fresh media (Advanced RPMI supplemented with antibiotics and 2% of FBS, all from GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with low-dose enzymes (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of collagenase, hyaluronidase and deoxyribonuclease) at 37°C with moderate shaking. After 16.5 h, culture supernatant, containing a mixture of intraepithelial and lamina propria lymphocytes, was centrifuged and pelleted. Lymphocytes were counted under a haemocytometer chamber, and cell viability was measured by trypan blue exclusion, being always higher than 90%. Cells were resuspended at a final concentration of 1×10^6 lymphocytes/mL. This protocol has previously demonstrated good viability ($\geq 90\%$) and good performance in flow cytometry experiments.¹¹

2.4. Flow cytometry

2.4.1. Membrane staining

Isolated mucosal lymphocytes were stained with fluorochrome-labelled monoclonal antibodies, including anti-TCR $\alpha\beta$ -FITC (clone WT31), anti-CD8-PE (clone SK1), anti-TCR $\gamma\delta$ -FITC or PE (clone

Table 1. Demographic features and drug use in patients and controls.

Variable	CC (<i>n</i> = 15)	LC (<i>n</i> = 8)	HCS (<i>n</i> = 10)
Sex (male/female)	1/14	4/4	6/4
Age (years) (mean \pm SEM)	53 \pm 3	65 \pm 4	50 \pm 2
Disease duration (months) (median, IQI)	4 (3–5)	5 (4–12)	-
Bowel movements per day (median; IQI)	5 (4–6)	6 (3–9)	-
NSAID use at diagnosis	4 (2 ibuprofen, 1 indomethacin, 1 naproxen)	0	0
Autoimmune diseases	2 (1 rheumatoid arthritis, 1 thyroiditis)	0	0

CC, collagenous colitis; LC, lymphocytic colitis; HCS, Healthy controls; NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drug; SEM: standard error of mean; IQI: Interquartile interval, percentile 25 – percentile 75. All comparisons between CC and LC were nonsignificant.

11F2), anti-CD3-PerCP (clone SK7), and anti-CD45-APC (clone 2D1) (all from BD Biosciences, NJ, USA), and anti-CD8-APC (clone 3B5) (from Invitrogen, CA, USA). Surface staining was done at room temperature for 15 min. Treg cells were determined using the Anti-Human-FOXP3 Staining Set PE kit (eBioscience, CA, USA), following the manufacturer's instructions. In all flow cytometry staining procedures, 100 000 lymphocytes were used, except for Treg staining, for which double the amount was used.

2.4.2. Intracellular cytokine staining and cell culture

For intracellular cytokine staining, 10^6 cells/mL were placed into 96-well culture plates with or without 10 ng/mL PMA, 100 ng/mL Ionomycin, and 10 ng/mL Brefeldin A (Sigma Aldrich, MO, USA) for 6 h, as described elsewhere.^{13,14} The FIX & PERM cell fixation and permeabilization kit (CaltagMedSystems, Buckingham, UK) was used, following the manufacturer's instructions. Intracellular antibodies were anti-human-IFN- γ -PE (clone 4S.B3) and anti-human-IL-17A-PE (clone eBio64, both from e-Bioscience, CA, USA). Appropriate isotype-matched controls from the same suppliers were included in intracellular staining to ensure proper compensation and staining specificity.

2.4.3. Gating strategy

At least 10 000 cells in the lymphocyte forward scatter/side scatter (FSC/SSC) gate per tube were acquired in a 4-colour FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, NJ, USA) and analysis was carried out using Cell-QuestPRO Software. Results were expressed as percentages of the lineage marker/low SSC gate.

2.5. RNA extraction and relative quantification by real-time PCR

Two colonic biopsies from each patient and control were then preserved on ice-chilled RNA Later (Ambion, USA), left overnight at 4°C, and stored at -80°C until analysis. Biopsies were subsequently homogenized with Qiazol reagent (Qiagen, Hilden, Germany) using the GENTLEMACS dissociator (MiltenyiBiotec, Gladbach, Germany). Total RNA was extracted with miRNeasyMinikit and the Qiacube automated sample preparer (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. Combined primers and probes were purchased from Integrated DNA Technologies (Iowa, USA): hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT) (Hs.PT.58v.46521572), IFN- γ (Hs.PT.53a.26729425), IL-10 (Hs.PT.53a.2807216), IL-15 (Hs.PT.58.21299580), IL-17-A (Hs.PT.53a.2545178), TGF- β (Hs.PT.53a.20231516), IL-21 (Hs.PT.58.22750196), IL-23 (Hs.PT.58.38730006.g), TNF- α (Hs.PT.53a.21488839), and FOXP3 (Hs.PT.53a.4225152). Reactions were performed in a 7300 PCR system (Applied Biosystems, CA, USA) and the Premix Ex Taq (TAKARA, Japan). PCR conditions were set as recommended by the manufacturers. All reactions were performed in triplicate. Relative values (expressed as fold change relative to control group) were calculated with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.¹⁵ Every gene of interest was normalized against an endogenous control (reference gene, HPRT), and values were related to the control group mean.

2.6. Protein level measurement (ELISA)

Two colonic biopsies were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. Tissue homogenates were prepared with a GentleMACS tissue dissociator (protein program, in C tubes, MiltenyiBiotec, Germany), as described elsewhere.¹⁶ Biopsies were weighed (ranging 20 to 60 mg) before disruption. In order to use the same concentration of starting material in all experiments, the amount of T-Per reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,

USA) to be added was calculated proportionally for each sample (1000 μ L of T-Per for every 25 mg of tissue). Protease inhibitor cocktail (2 mM phenylmethanesulfonylfluoride, 40 μ M bestatinhydrochloride, 15 μ M pepstatin A, 14 μ M E-64, and 20 μ M leupeptin diluted in a 1 mM EDTA solution, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) was added before freezing. Homogenates were kept at -80°C until further analysis. Culture supernatants were obtained from two biopsies. After collection, a smooth mucus removal treatment (1 mM DTT/1 mM EDTA in HBSS) was done for 25 min and then biopsies were put on culture at 37°C in a 5% CO₂ incubator with complete Advanced RPMI media (2% FBS). After 24 h supernatants were collected, centrifuged, and stored at -80°C until use. Human IL-17-A and IFN- γ ELISA kits were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), Human IL-15 and IL-10 ELISA kits were purchased from Millipore (Billerica, Massachusetts, USA), and TNF and TGF ELISA kits were from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). All assays were performed in duplicate following the manufacturers' instructions, and results expressed as ng/mL (that is, ng/25 mg homogenated tissue).

2.7. Statistics

Number of cells recovered is expressed as mean \pm SD, whereas flow cytometry, qPCR, and ELISA results are expressed as median (interquartile range). Nonparametric tests were used for comparison between groups (Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests). Pearson correlation analysis was performed to correlate the degree of diarrhoea and all the parameters analyzed (cells, mRNA, and protein levels). Statistical analysis was performed using SPSS software (IBM, NY, USA). Statistical significance was assumed for *p* values <0.05.

3. Results

3.1. Absolute cell number

The total number of cells recovered from 10 biopsies was significantly higher in CC and LC compared with HCs (CC, $1.52 \times 10^6 \pm 0.98 \times 10^6$; LC, $1.6 \times 10^6 \pm 0.56 \times 10^6$; HCs, $0.58 \times 10^6 \pm 0.28 \times 10^6$; *p* < 0.001). No differences were found between CC and LC (*p* = 0.506).

3.2. Mucosal lymphocyte immunophenotype

Mucosal lymphocytes were characterized by flow cytometry. Gating strategy is shown in Figure 1. Main lymphocyte subsets (CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, and CD3⁺CD8⁺) and their T cell receptor (TCR) expression (TCR $\alpha\beta$ or TCR $\gamma\delta$) are shown in Figure 2. Total CD3⁺ and CD3⁺CD8⁺ cells were higher in LC patients compared with HCs and CC (*p* = 0.001 and *p* = 0.022, respectively), while CD3⁺CD4⁺ were lower in LC patients compared with HCs (*p* = 0.002). No differences were found in TCR (TCR $\alpha\beta$ and TCR $\gamma\delta$) expression in CD3⁺ and CD3⁺CD8⁺ T lymphocytes between the three groups.

However, we detected a significant increase in TCR $\gamma\delta$ ⁺ percentages among the CD4⁺ subset in LC (*p* = 0.047), in which total CD4⁺ cells were reduced. Considering that TCR $\gamma\delta$ ⁺ cells are of crucial importance in coeliac disease pathogenesis¹⁷ and that some studies suggest that coeliac disease may be associated with MC,^{18,19} we then determined IL-15 levels, a critical cytokine in coeliac disease pathogenesis,²⁰ for both mRNA and protein expression. IL-15 mRNA expression was slightly higher in LC (2.6-fold, *p* = 0.002), but not in CC (1.4-fold, *p* = 0.09) when compared with controls, in accordance with the TCR $\gamma\delta$ ⁺ pattern found in LC. However, no significant differences in IL-15 protein levels were noted among the three groups (Figure 3). IL-15 induces an increase in intraepithelial

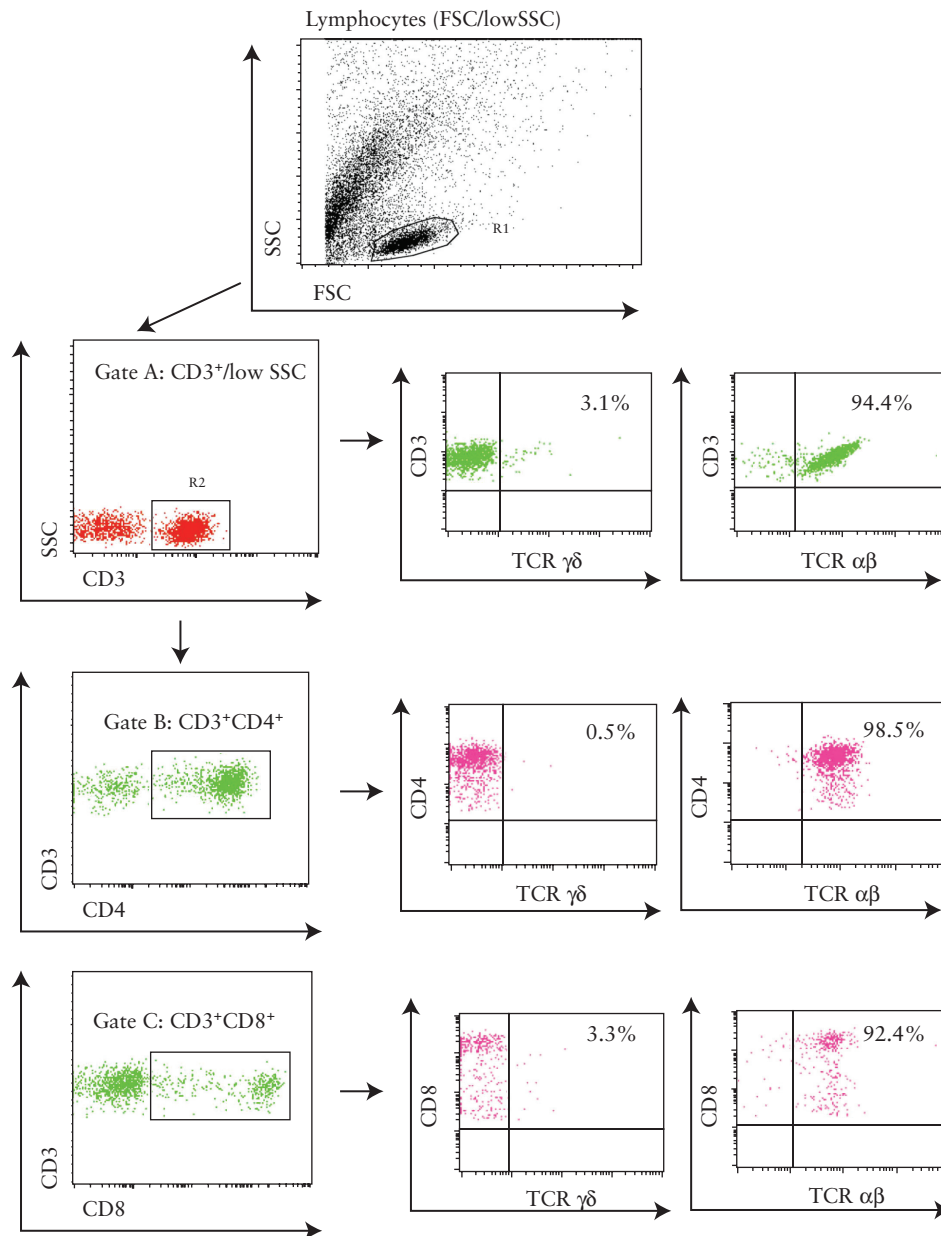


Figure 1. Representative gating strategy for lymphocyte profile measurement by flow cytometry. Images are representative of a collagenous colitis patient.

TCR $\gamma\delta^+$ lymphocytes in cultured duodenal biopsies of coeliac disease.²¹ Thus, our results suggest that a similar mechanism may be acting in LC colonic mucosa.

3.3. Unconventional T cells

Double-positive (DP) (CD3⁺CD4⁺CD8⁺) and double-negative (DN) (CD3⁺CD4⁻CD8⁻) T cells are two rare subsets whose role in intestinal homeostasis is poorly known. DP T cells were lower in LC compared with CC and HCs (Figure 4B, $p = 0.047$), while DN T cells were higher in both LC and CC compared with HCs (Figure 4C, $p = 0.038$).

3.4. Regulatory T cell profile

Both CC and LC patients had higher tissue FOXP3 mRNA expression compared with HCs (Figure 5B, $p < 0.001$); this was higher in CC patients compared with LC patients ($p = 0.001$). To further

confirm these results, we also determined the presence of mucosal CD25⁺FOXP3⁺ Treg by flow cytometry (Figure 5A), revealing a higher proportion of mucosal Treg cells in both CC and LC patients compared with controls (Figure 5C, $p = 0.001$). CD4⁺ T cells expressing intracellular FOXP3 but lacking CD25 expression in the membrane were also higher in both CC and LC compared with HCs (Figure 5E, $p = 0.041$). Overall intracellular expression of FOXP3 (CD25⁺plus CD25⁻) in mucosal CD4⁺ T lymphocytes was higher in both CC and LC compared with controls (Figure 5D, $p = 0.004$). However, unlike the gene expression results, no statistical difference was found between CC and LC patients when studied by flow cytometry.

Since an increase in Treg cells and mRNA FOXP3 was found in both CC and LC, and given that Treg cells can elicit their immunosuppressive function via IL-10, we next determined mucosal IL-10 production in these patients. The levels of anti-inflammatory IL-10

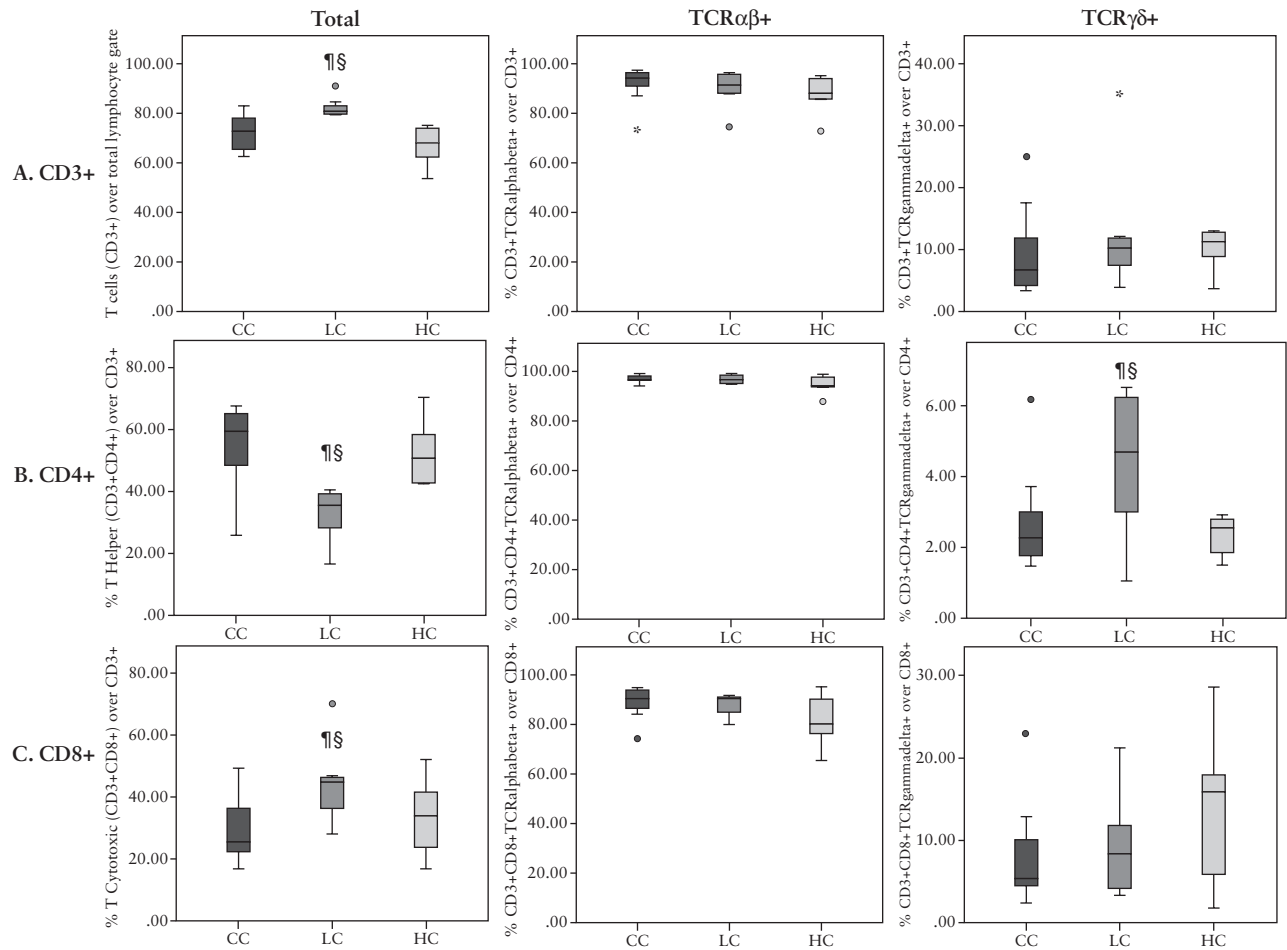


Figure 2. Box plots for percentages of lymphocytes and their T cell Receptor (TCR) expression. Total percentages are expressed over the lymphocyte FSC/SSC gate (CD3+) or the CD3+/lowSSC gate (CD4+ and CD8+). TCR $\gamma\delta$ + and TCR $\alpha\beta$ + percentages are expressed over the: (A) T lymphocyte (CD3+), (B) T helper lymphocyte (CD3+CD4+), or (C) T cytotoxic lymphocyte (CD3+CD8+) gate, respectively. CC: collagenous colitis ($n = 14$); LC: lymphocytic colitis ($n = 8$); HCs: healthy controls ($n = 10$). $\#p < 0.05$ vs CC; $\S p < 0.05$ vs HCs.

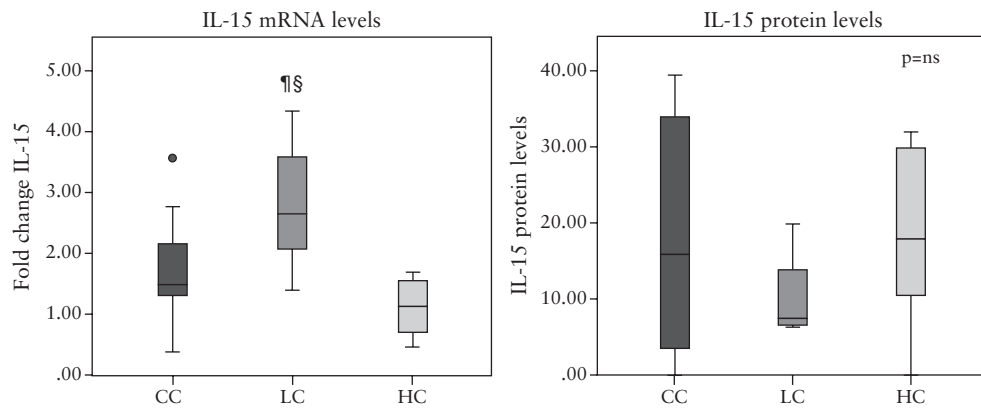


Figure 3. Box plots for gene expression measured by real-time PCR (left) and protein levels in biopsy homogenates measured by ELISA (right) for IL-15. CC: collagenous colitis ($n = 15$); LC: lymphocytic colitis ($n = 8$); HCs: healthy controls ($n = 8$). $\#p < 0.05$ vs CC; $\S p < 0.05$ vs HCs.

mRNA were slightly higher in LC (2-fold, $p = 0.050$) and CC (1.5-fold, $p = 0.008$) compared with HCs (Figure 6A). Protein levels of IL-10 were also consistently higher in both CC ($p = 0.002$) and LC ($p < 0.001$) compared with controls (Figure 6B). These results were further confirmed by measuring the amount of soluble IL10

secreted by biopsies after 24 h of *in vitro* culture. Levels of IL-10 released into the culture media were significantly higher in both CC and LC compared with HCs ($p = 0.000$, Figure 6C), confirming that IL-10 synthesis and secretion are clearly activated in both LC and CC (Figure 6).

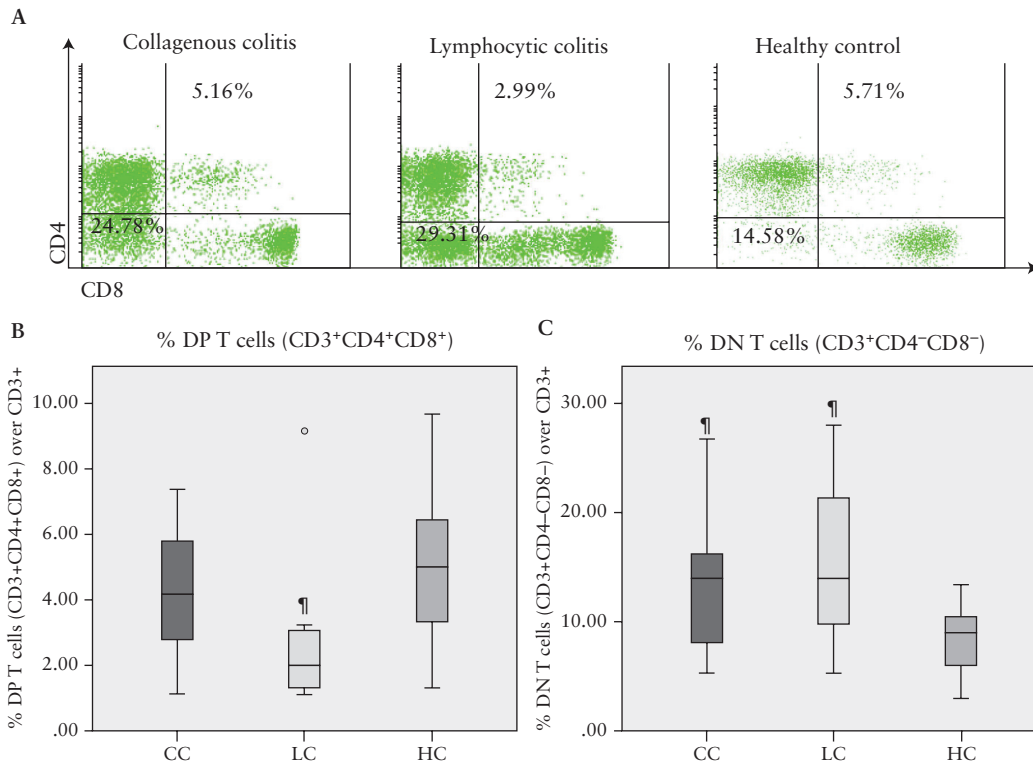


Figure 4. Identification of double-positive (DP) and double-negative (DN) T cells by flow cytometry. (A) DP and DNT cells gated over total T lymphocytes (CD3⁺). Graphs are representative of several independent experiments. Box plots for percentages of DPT cells (B) and DNT T cells (C). CC: collagenous colitis ($n = 14$); LC: lymphocytic colitis ($n = 8$); HCs: healthy controls ($n = 10$). * $p < 0.05$ vs HCs.

We also determined the mRNA and protein levels of the anti-inflammatory TGF- β , which is another anti-inflammatory Treg cell-derived cytokine, and we found no differences between LC, CC, and HCs (data not shown), suggesting that Treg cells in MC do not elicit their function by TGF- β production.

3.5. Th1 and Th17 lymphocytes

Microscopic colitis is considered to present a Th1 and Th17 pattern.^{5,6} This assumption is based on gene expression studies that demonstrate overexpression of Th1- and Th17-related cytokines.^{5,6} However, to the best of our knowledge the expansion of IFN- γ and IL-17-A producing T cells in MC mucosa has never been assessed. In order to detect Th1 and Th17 cells, intracellular cytokine production in PMA/Ionomycin-stimulated mucosal lymphocytes culture was assessed with flow cytometry (Figure 7). Contrary to expectations, we found that in both CC and LC, IFN- γ - and IL-17-A-producing cells were lower in comparison with healthy controls, in both the stimulated and the unstimulated culture (Figure 7). This phenomenon was observed consistently in total T cells (CD3⁺), including Thc1/Th1 and Th17/Tc17 (Figure 7A) and also in the CD3⁺CD4⁺ (Th1/Th17 T cells) fraction (Figure 7B).

Given this apparent contradiction with previous literature, we decided to analyse conventional Th1 and Th17 cytokines at the gene expression (mRNA) and total protein load level.

IFN- γ and TNF- α are two pleiotropic cytokines that act as potent immune activators. IFN- γ , considered the main Th1 cytokine, was markedly upregulated in both conditions, LC (49-fold, $p = 0.000$) and CC (13-fold, $p = 0.000$), when compared with HCs. IFN- γ gene expression was significantly higher in LC compared with CC ($p = 0.001$). Protein levels act in the opposite manner,

with a significant decrease in CC ($p = 0.013$) and no changes in LC ($p = 0.798$) compared with HCs (Figure 8A).

TNF- α is primarily expressed by macrophages, but also by other immune cells, including activated Th1 lymphocytes. TNF- α mRNA levels were increased in both LC (2-fold, $p = 0.021$) and CC (2.5-fold, $p = 0.005$) compared with HCs, although protein levels were equal in the three groups (Figure 8B).

Regarding the Th17 cytokine pattern, we determined the levels of the two main cytokines secreted by Th17 cells: IL-21 and IL-17-A. IL-17-A mRNA was upregulated in both LC (4.8-fold, $p = 0.001$) and CC (2.8-fold, $p = 0.000$) compared with HCs. However, no significant differences in IL-17-A protein levels were noted between the three groups (Figure 8C). IL-21 mRNA levels were increased in both LC (7-fold, $p < 0.001$) and CC (6-fold, $p < 0.001$), compared with HCs (Figure 8D). Interestingly, in none of the Th17 parameters evaluated (gene expression, protein levels, and cells) were differences noted between CC and LC. Taking together gene expression and flow cytometry results, we then assessed gene expression levels of IL-23, a cytokine that is essential for Th17 cell differentiation and expansion, and found that IL-23 mRNA levels were increased in both LC (3-fold, $p = 0.040$) and CC (4-fold, $p = 0.002$) compared with controls (Figure 8E).

Therefore, we demonstrated that despite a clear increase in Th1/Th17-related cytokine gene expression, neither protein levels nor their producing T cells are upregulated in MC mucosa. Hence, it may be concluded that MC, unlike IBD disorders, does not present a Th1/Th17-specific pattern.

3.6. Relation with clinical activity

Finally, we investigated possible correlation between any of the mucosal parameters we assessed and clinical activity of the disease

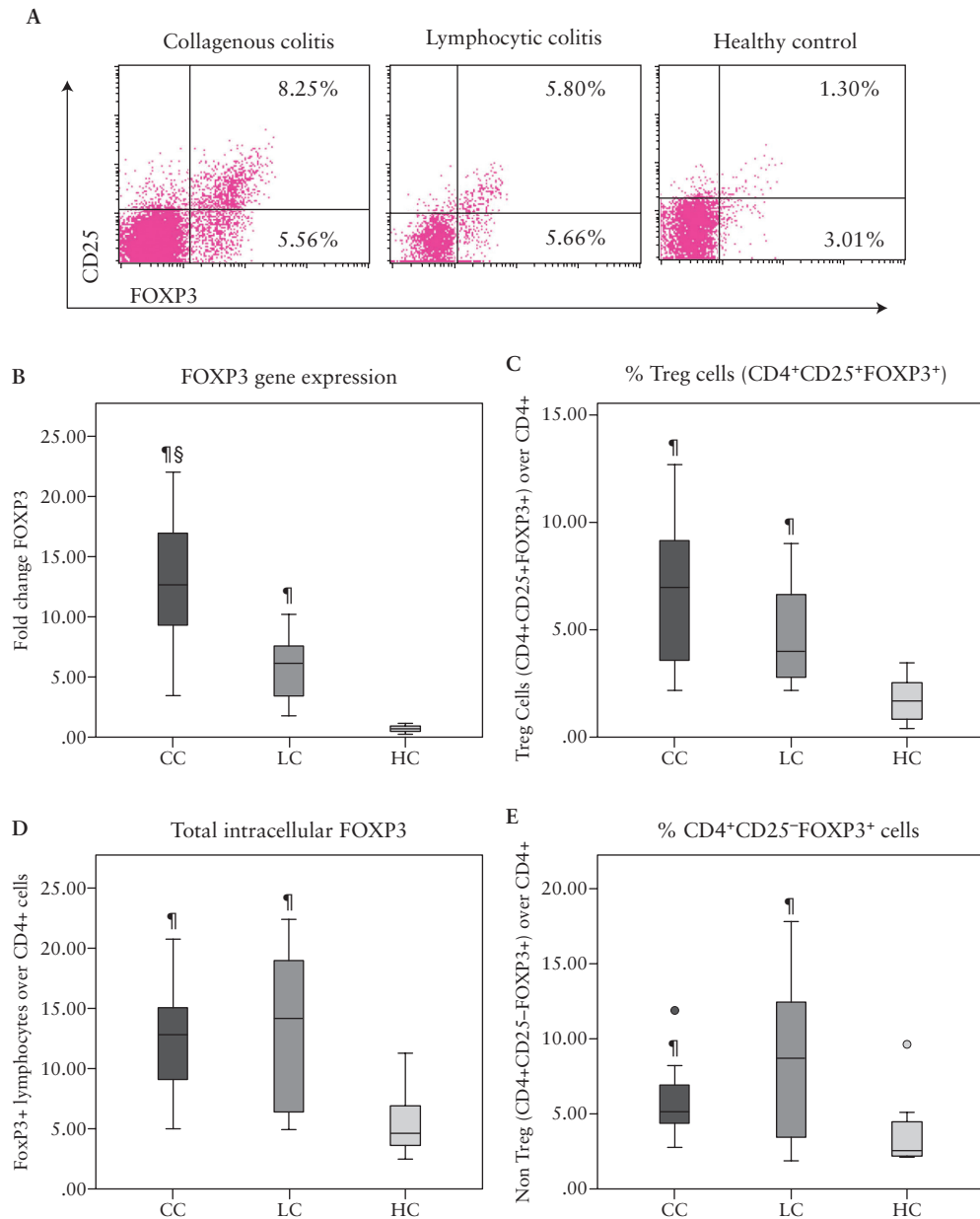


Figure 5. Identification of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Treg T cells and CD4⁺CD25⁻FOXP3⁺ T cells by flow cytometry. (A) Percentages are expressed over CD4⁺ T cells. Graphs are representative of several independent experiments. Box plots for (B) FOXP3 mucosal gene expression measured by real-time PCR, and (C, D, and E) FOXP3⁺ intracellular expression obtained by flow cytometry. FOXP3⁺ positive cells are expressed as percentages of: (D) total CD4⁺ T cells (irrespective of CD25 expression); (E) CD4⁺CD25⁻T cells (classical Treg), and (C) CD4⁺CD25⁺ T cells. CC: collagenous colitis ($n = 14$); LC: lymphocytic colitis ($n = 8$); HCs: healthy controls ($n = 8$). [¶] $p < 0.05$ vs HCs. [§] $p < 0.05$ vs LC.

(measured as bowel movements per day). There were significant moderate positive correlations between the number of daily stools and mRNA levels of IL-15 ($r = 0.438$, $p = 0.037$), IL-17 ($r = 0.480$, $p = 0.024$), and IFN- γ ($r = 0.626$, $p = 0.001$), as previously shown.⁵ By contrast, there were no significant correlations with the other measured parameters (cell and protein levels).

4. Discussion

This is the first time, to our knowledge, in which mucosal T-cells and the associated cytokine milieu have been assessed simultaneously in the same cohort of MC patients. Some differences between LC

and CC were found, including a higher proportion of CD4⁺TCR $\gamma\delta$ ⁺ and CD8⁺, and a lower proportion of CD4⁺ and DP T cells in LC patients, as previously reported.^{8,22} These changes were coupled with differences in the cytokine milieu, as revealed by higher levels of IL-15, and IFN- γ mRNA in LC that are not seen in CC. In spite of these differences between CC and LC, a number of similarities in immune response in the two forms of MC were found, such as an increase in regulatory and decrease in Th1/Th17 effector T cells. Together, these results suggest that LC and CC are different but related entities sharing some regulatory and effector mechanisms. Tables 2 and 3 summarize the results for the mucosal lymphocyte and cytokine profile in both CC and LC.

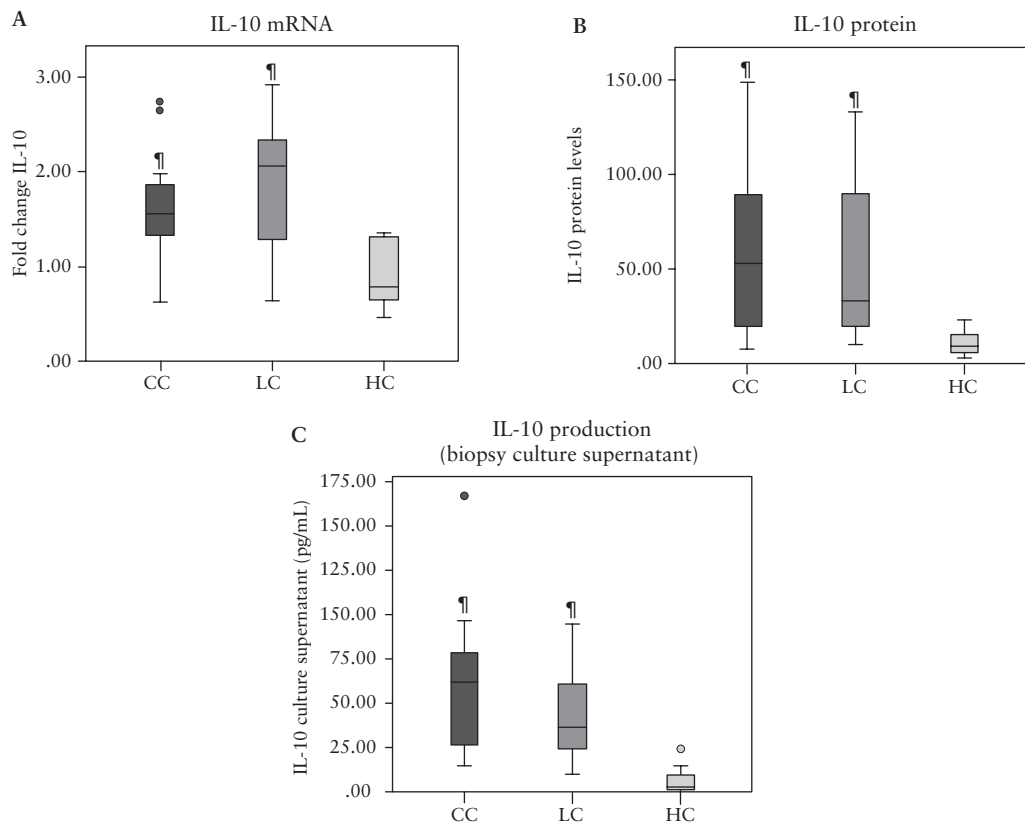


Figure 6. Anti-inflammatory IL-10 levels. Gene expression was measured by real-time PCR (A). Protein levels were measured by ELISA, either in biopsy homogenates (B) or secreted in biopsy culture (24 h, 37°C, 5% CO₂) supernatants (C). CC: collagenous colitis ($n = 15$); LC: lymphocytic colitis ($n = 8$); HCs: healthy controls ($n = 8$). * $p < 0.05$ vs HCs.

A dramatic increase in cytotoxic T lymphocytes (CD3⁺CD8⁺) was found only in LC, confirming previous studies.^{8,22} Further mechanistic studies are needed to elucidate their role in the LC mucosa and to determine whether their functionality is comparable between LC and CC.

We demonstrate for the first time an increment of CD4⁺TCR $\gamma\delta$ ⁺ cells in LC patients compared with CC and HC participants. The function of intestinal TCR $\gamma\delta$ ⁺ lymphocytes has been a matter of intense debate, with some evidence suggesting an immunoregulatory role, as pointed in coeliac disease patients.²³ Indeed, IL-15, a cytokine overexpressed in coeliac disease and related to innate immunity,²⁴ was higher in LC and remained equal to controls in CC. In contrast, a previous study revealed increased IL-15 mRNA in MC, without differences between CC and LC.⁶ Differences in patient selection, including patients in clinical remission and patients under specific treatment in the later study, might explain the differences. Together, the higher levels of mucosal IL-15 mRNA and CD4⁺TCR $\gamma\delta$ ⁺ T-cells found in the colon of LC patients might suggest the presence of a similar immunological fingerprint to that of coeliac disease, different from that displayed by CC patients.

The decrease in DP T cells observed only in LC patients is in contrast with previous studies showing an increase in this cell type only in CC.²² It has also been reported by that same group that these DP T cells are increased in post-dysentery diarrhoea-predominant IBS patients.²⁵ By contrast, a study performed by our group demonstrated that DP T cells have a location-specific pattern in healthy subjects (increased in the ileum compared with the colon) that is maintained even in the presence of IBD.²⁶ It has been suggested that these cells may play a homeostatic role, being polyvalent in order

to develop different phenotypes under different circumstances. In fact, DP T cells have been proposed as effector cells with a memory phenotype capable of producing different and/or higher levels of cytokines in comparison with single positive T cells.²⁷ At any rate, there is no clear explanation for the differences observed in MC patients, and further studies are required to elucidate this question, since DP cell function is still not clearly understood.

DN T cells were increased in both active CC and LC patients in comparison with HCs, without differences between them. The function and specific phenotype of DN T cells in intestinal mucosa is currently unknown and requires extensive research. However, as DN T cells have demonstrated a potent anti-inflammatory role in other diseases,²⁸⁻³¹ it may be speculated that DN T cells have a protective anti-inflammatory role in the intestinal mucosa and might protect MC mucosa from undergoing uncontrolled inflammation.

Regulatory T cells (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) were similarly increased in both CC and LC, and a consistent increase in *Foxp3* gene expression was found in both MC subtypes. Similar results were previously obtained using immunohistochemical techniques in fixed tissue.^{7,8,32} Non-Treg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T cells were also increased in both CC and LC patients. This T cell subtype has been found to be increased in some autoimmune conditions and also seems to have a regulatory profile.³³ Regulatory functional cells with FOXP3⁺ expression and an immunosuppressive role have been described in IBD.³⁴⁻³⁶ Notwithstanding, functional studies demonstrating the immunosuppressive capacity of FOXP3⁺ cells in MC colonic mucosa are required. However, it is well established that Treg cells exert their immunosuppressive function in

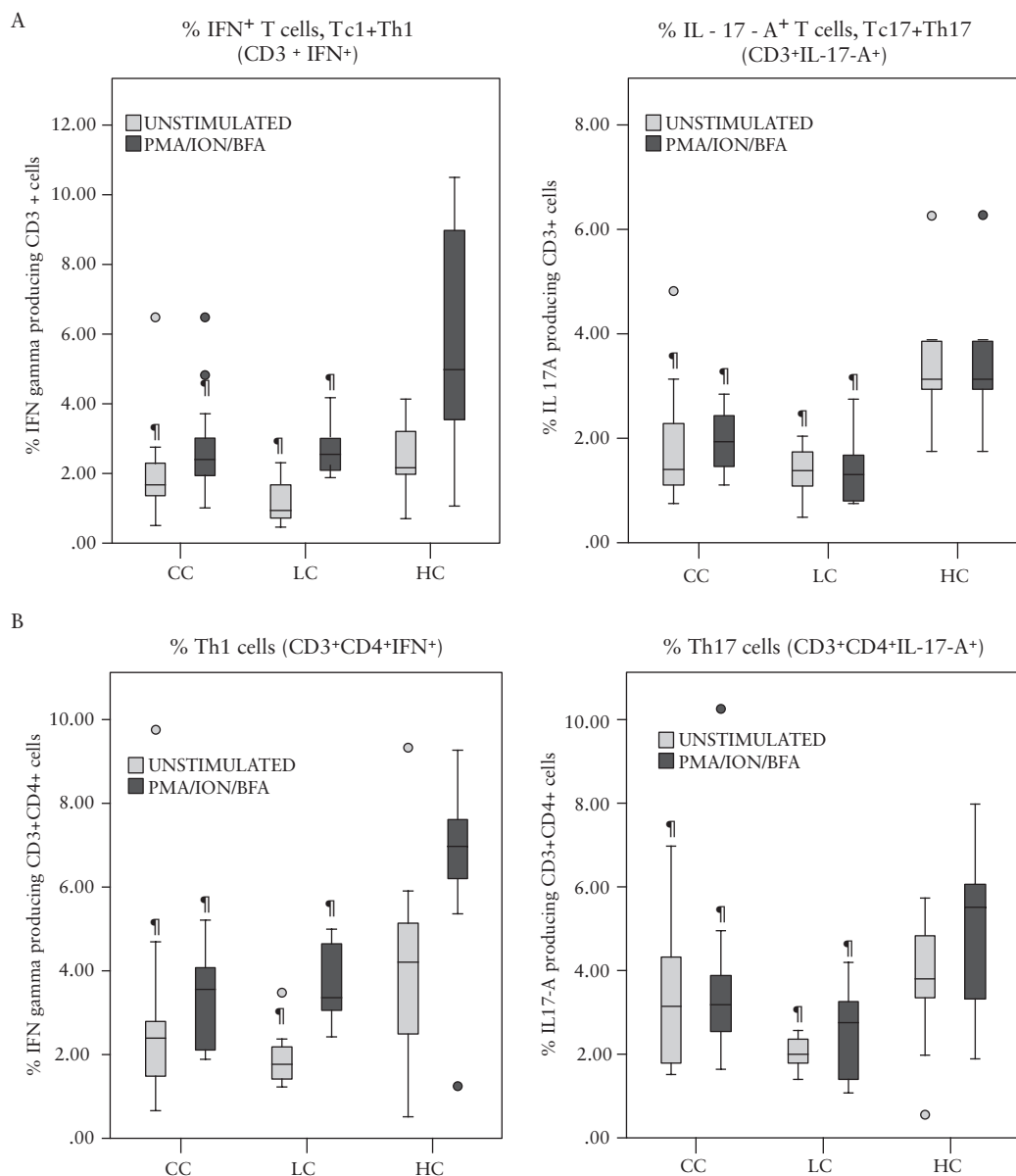


Figure 7. Box plots for IFN- γ and IL-17-A producing cells over CD3⁺ cells (A) and CD3⁺CD4⁺ cells (B). CC: collagenous colitis ($n = 14$); LC: lymphocytic colitis ($n = 8$); HCs: healthy controls ($n = 10$). * $p < 0.05$ vs HCs.

part through production of IL-10,³⁷ the most important immunoregulatory cytokine in the gut.³⁸ In this regard, in the present study IL-10 was increased in both CC and LC, showing a good correlation between mRNA and protein levels, in both tissue and culture supernatant.

Several studies have investigated cytokine pattern in MC by assessing gene expression levels by real-time PCR.^{6,39,40} However, these studies are incomplete since a strikingly low correlation between mRNA and protein levels has been described in many scenarios.⁴¹ To our knowledge there is only one previous study in which both colonic gene and protein expression were determined.⁵ In our study, despite having found a strong and clear increment in proinflammatory cytokine mRNA levels (IFN- γ , IL-17-A, TNF- α), protein levels were equal or even reduced in MC patients as compared with HCs. This finding is similar to previous studies,⁵ in which MC patients demonstrated a mixed Tc1/Th1 and Tc17/

Th17 mucosal cytokine profile. We have expanded this observation and found reduced intracellular expression of IFN- γ and IL-17-A in T cells, clearly showing that there is no such response in MC patients. In fact, IL17 and IFN- γ are produced by many other cell types, such as the newly described innate lymphoid cells, which may explain in part the lack of concordance.^{42,43} Hence, assumptions of cellular behaviour based solely on gene expression need to be carefully re-evaluated.

At any rate, there was an increased pro-inflammatory cytokine gene expression, whereas protein levels remained unchanged. It has been suggested that protein levels cannot be detected because of rapid degradation and consumption by cells.⁵ However, another possible explanation is that there was suppression at a post-transcriptional level of gene expression, induced either by regulatory cells such as DN T cells or by Treg cells, or by microRNA regulation.^{39,44} This last explanation would be in concordance with the

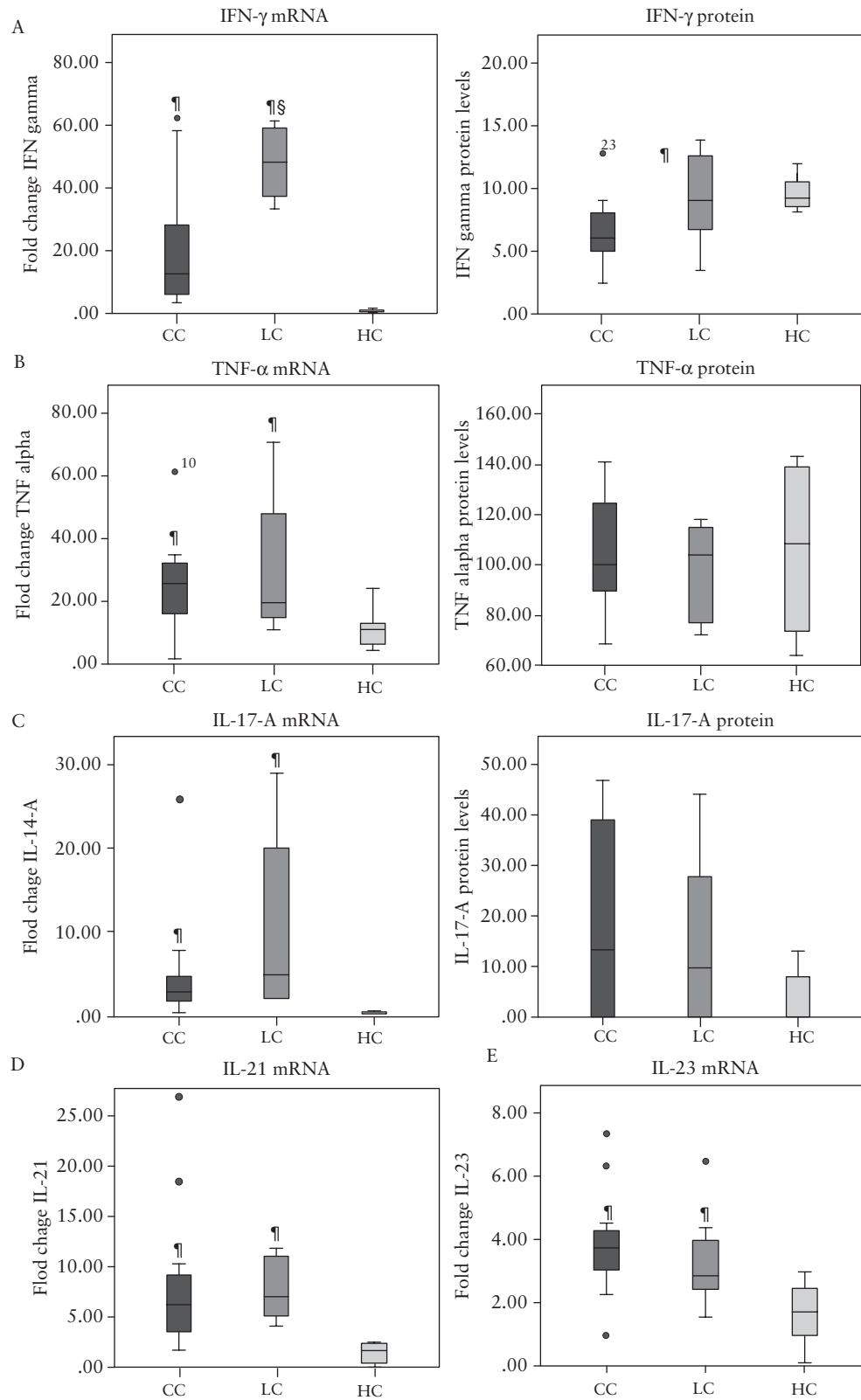


Figure 8. Box plots for gene expression measured by real-time PCR and protein levels in biopsy homogenates measured by ELISA Th1/Th17-related cytokines. CC: collagenous colitis ($n = 15$); LC: lymphocytic colitis ($n = 7$); HCs: healthy controls ($n = 8$). * $p < 0.05$ vs HCs. § $p < 0.05$ vs LC.

absence of macroscopic damage in CM. According to this, IL-10, the most important immunoregulatory cytokine in the gut,³⁸ is the only one of these that showed a good correlation between mRNA and

protein levels, in both tissue and culture supernatant, highlighting the existence of an anti-inflammatory *milieu* that keeps inflammation at minimum levels in MC mucosa.

Table 2. Summary of the mucosal lymphocytic T cell profile in both LC and CC as compared with healthy controls (↑, ↓, or =; increased, decreased, or unchanged).

Parameter	LC	CC
Number of cells	↑↑	↑↑
CD4 ⁺	↓	=
CD8 ⁺	↑	=
CD4 ⁺ γδ ⁺	↑↑	=
DP	↓	=
DN	↑↑	↑↑
Th1/Th17	↓↓	↓↓
Treg	↑↑	↑↑

Table 3. Summary of mucosal cytokine profile in both CC and LC as compared with healthy controls. (↑, ↓, or =; increased, decreased, or unchanged). NA = not analysed.

Cytokine	LC		CC	
	mRNA	Protein	mRNA	Protein
IL-15	↑	=	=	=
IL-10	↑	↑	↑	↑
TGF-β	=	=	=	=
IFN-γ	↑↑↑	=	↑↑	↓
TNF-α	↑	=	↑	=
IL-17-A	↑↑	=	↑	=
IL-21	↑	NA	↑	NA
IL-23	↑	NA	↑	NA

In conclusion, LC and CC are different but related entities sharing some regulatory and effector mechanisms. Of note, different types of immunoregulatory mechanisms are highly expressed in both CC and LC, which might be important in maintaining inflammation at a microscopic level in these entities.

Funding

This work was supported by a 2010 basic research grant from 'Acadèmia de Ciències Mèdiques i de la Salut de Catalunya i de Balears' (Barcelona, Spain).

Conflict of Interest

None declared.

Acknowledgments

We thank Dr José Maria Hernández Pérez and Lourdes Fluvía of the Proteomics and Metabolomics Laboratory of the Health Sciences Research Institute of the 'Germans Trias i Pujol' Foundation (IGTP) for their assistance when carrying out ELISA. We thank Dr David Bernardo for his valuable comments on experimental techniques. We thank Manel González Roldán, Joanna Pascual Villani, M^a Àngels Sánchez Visiedo, and Natalia Cardozo for their helpful technical assistance. The authors thank the nursing team of Núria Rubies, Maite Roldán, Olga Benítez, Anabel Polo, and Rosa Tomás for their invaluable assistance in sample collection.

Author contributions

AC designed and performed all the laboratory experiments, performed statistical analysis, prepared the figures, and drafted the manuscript. FFB, MR, MA, YZ, and ME recruited patients and did biopsy collection. EP designed and contributed to qPCR experiments. AS performed immunohistochemical studies and microscopic diagnosis. FFB conceived and designed the study, revised,

edited, and finalized the manuscript, coordinated the research group, and directed the execution of the study. All authors read and approved the final version of the manuscript.

References

- Munch A, Aust D, Bohr J, *et al.* Microscopic colitis: Current status, present and future challenges: Statements of the European Microscopic Colitis Group. *J Crohns Colitis* 2012;**6**(9):932–45.
- Järnerot G, Tysk C, Bohr J, Eriksson S. Collagenous colitis and fecal stream diversion. *Gastroenterology* 1995;**109**(2):449–55.
- Rasmussen MA, Munck LK. Systematic review: Are lymphocytic colitis and collagenous colitis two subtypes of the same disease – microscopic colitis? *Aliment Pharmacol Ther* 2012;**36**(2):79–90.
- Fernandez-Bañares F, Gisbert JP. Letter: Are lymphocytic colitis and collagenous colitis really the same disease? *Aliment Pharmacol Ther* 2012;**36**(6):606.
- Kumawat AK, Strid H, Tysk C, Bohr J, Hornquist EH. Microscopic colitis patients demonstrate a mixed Th17/Tc17 and Th1/Tc1 mucosal cytokine profile. *Mol Immunol* 2013;**55**(3–4):355–64.
- Tagkalidis PP, Gibson PR, Bhathal PS. Microscopic colitis demonstrates a T helper cell type 1 mucosal cytokine profile. *J Clin Pathol* 2007;**60**(4):382–7.
- Fernández-Bañares F, Casals J, Salas A, *et al.* Paucicellular lymphocytic colitis: Is it a minor form of lymphocytic colitis? A clinical pathological and immunological study. *Am J Gastroenterol* 2009;**104**(5):1189–98.
- Bai S, Siegal GP, Jhala NC. Foxp3 expression patterns in microscopic colitides: A clinicopathologic study of 69 patients. *Am J Clin Pathol* 2012;**137**(6):931–6.
- Salas A, Fernández-Bañares F, Casals J, *et al.* Subepithelial myofibroblasts and tenascin expression in microscopic colitis. *Histopathology* 2003;**43**(1):48–54.
- Fernández-Bañares F, Salas A, Forné M, Esteve M, Espinós J, Viver JM. Incidence of collagenous and lymphocytic colitis: A 5-year population-based study. *Am J Gastroenterol* 1999;**94**(2):418–23.
- Carrasco A, Mañé J, Santaolalla R, *et al.* Comparison of lymphocyte isolation methods for endoscopic biopsy specimens from the colonic mucosa. *J Immunol Methods* 2013;**389**(1–2):29–37.
- Santaolalla R, Mañé J, Pedrosa E, *et al.* Apoptosis resistance of mucosal lymphocytes and IL-10 deficiency in patients with steroid-refractory Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2011;**17**(7):1490–500.
- Olsen I, Sollid LM. Pitfalls in determining the cytokine profile of human T cells. *J Immunol Methods* 2013;**390**(1–2):106–12.
- Muris AH, Damoiseaux J, Smolders J, Cohen Tervaert JW, Hupperts R, Thewissen M. Intracellular IL-10 detection in T cells by flowcytometry: The use of protein transport inhibitors revisited. *J Immunol Methods* 2012;**381**(1–2):59–65.
- Dussault AA, Pouliot M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. *Biol Proced Online* 2006;**8**:1–10.
- Chaput N, Louafi S, Bardier A, *et al.* Identification of CD8+CD25+Foxp3+ suppressive T cells in colorectal cancer tissue. *Gut* 2009;**58**(4):520–9.
- Camarero C, Eiras P, Asensio A, *et al.* Intraepithelial lymphocytes and coeliac disease: Permanent changes in CD3-/CD7+ and T cell receptor gamma/delta subsets studied by flow cytometry. *Acta Paediatr* 2000;**89**(3):285–90.
- Guagnozzi D, Lucendo AJ, Angueira T, Gonzalez-Castillo S, Tenias JM. Drug consumption and additional risk factors associated with microscopic colitis: Case-control study. *Rev Esp Enferm Dig* 2015;**107**(6):347–53.
- Vigren L, Tysk C, Strom M, *et al.* Celiac disease and other autoimmune diseases in patients with collagenous colitis. *Scand J Gastroenterol* 2013;**48**(8):944–50.
- Bernardo D, Garrote JA, Allegretti Y, *et al.* Higher constitutive IL15R alpha expression and lower IL-15 response threshold in coeliac disease patients. *Clin Exp Immunol* 2008;**154**(1):64–73.
- Maiuri L, Ciacci C, Vacca L, *et al.* IL-15 drives the specific migration of CD94+ and TCR-gammadelta+ intraepithelial lymphocytes in organ cultures of treated celiac patients. *Am J Gastroenterol* 2001;**96**(1):150–6.
- Kumawat AK, Strid H, Elgbratt K, Tysk C, Bohr J, Hultgren Hornquist E. Microscopic colitis patients have increased proportions of Ki67(+) proliferating, and finalized the manuscript, coordinated the research group, and directed the execution of the study. All authors read and approved the final version of the manuscript.

- erating and CD45RO(+) active/memory CD8(+) and CD4(+)(8(+)) mucosal T cells. *J Crohns Colitis* 2013;7(9):694–705.
23. Bhagat G, Naiyer AJ, Shah JG, *et al.* Small intestinal CD8+TCRgammadelta+NKG2A+ intraepithelial lymphocytes have attributes of regulatory cells in patients with celiac disease. *J Clin Invest* 2008;118(1):281–93.
 24. Abadie V, Jabri B. IL-15: a central regulator of celiac disease immunopathology. *Immunol Rev* 2014;260(1):221–34.
 25. Sundin J, Rangel I, Kumawat AK, Hultgren-Hornquist E, Brummer RJ. Aberrant mucosal lymphocyte number and subsets in the colon of post-infectious irritable bowel syndrome patients. *Scand J Gastroenterol* 2014;49(9):1068–75.
 26. Carrasco A, Fernandez-Bañares F, Zabana Y, *et al.* Doble Positivos (DP) y Doble Negativos (DN) en la mucosa intestinal: diferencias entre íleon y colon en la mucosa sana e inflamada. *Gastroenterol Hepatol* 2015;38(3 (Suplements)):1.
 27. Pahar B, Lackner AA, Veazey RS. Intestinal double-positive CD4+CD8+ T cells are highly activated memory cells with an increased capacity to produce cytokines. *Eur J Immunol* 2006;36(3):583–92.
 28. D'Acquisto F, Crompton T. CD3+CD4-CD8- (double negative) T cells: Saviours or villains of the immune response? *Biochem Pharmacol* 2011;82(4):333–40.
 29. Allgauer A, Schreiner E, Ferrazzi F, *et al.* IL-7 abrogates the immunosuppressive function of human double-negative T cells by activating Akt/mTOR signaling. *J Immunol* 2015;195(7):3139–48.
 30. Fischer K, Voelkl S, Heymann J, *et al.* Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood* 2005;105(7):2828–35.
 31. Voelkl S, Gary R, Mackensen A. Characterization of the immunoregulatory function of human TCR-alpha beta+ CD4- CD8- double-negative T cells. *Eur J Immunol* 2011;41(3):739–48.
 32. Goranzon C, Kumawat AK, Hultgren-Hornqvist E, *et al.* Immunohistochemical characterization of lymphocytes in microscopic colitis. *J Crohns Colitis* 2013;7(10):e434–42.
 33. Bonelli M, Goschl L, Bluml S, *et al.* CD4(+)/CD25(-)/Foxp3(+) T cells: A marker for lupus nephritis? *Arthritis Res Ther* 2014;16(2):R104.
 34. Holmén N, Lundgren A, Lundin S, *et al.* Functional CD4+CD25high regulatory T cells are enriched in the colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and increase with disease activity. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12(6):447–56.
 35. Makita S, Kanai T, Oshima S, *et al.* CD4+CD25bright T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. *J Immunol* 2004;173(5):3119–30.
 36. Kelsen J, Agnholt J, Hoffmann HJ, Rømer JL, Hvas CL, Dahlerup JF. FoxP3(+)/CD4(+)/CD25(+) T cells with regulatory properties can be cultured from colonic mucosa of patients with Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 2005;141(3):549–57.
 37. Liu H, Leung BP. CD4+CD25+ regulatory T cells in health and disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006;33(5–6):519–24.
 38. Paul G, Khare V, Gasche C. Inflamed gut mucosa: downstream of interleukin-10. *Eur J Clin Invest* 2012;42(1):95–109.
 39. Gunaltay S, Nyhlin N, Kumawat AK, *et al.* Differential expression of interleukin-1/Toll-like receptor signaling regulators in microscopic and ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2014;20(34):12249–59.
 40. Dey I, Beck PL, Chadee K. Lymphocytic colitis is associated with increased pro-inflammatory cytokine profile and up regulation of prostaglandin receptor EP4. *PLoS One* 2013;8(4):e61891.
 41. Evguenieva-Hackenberg E, Klug G. New aspects of RNA processing in prokaryotes. *Curr Opin Microbiol* 2011;14(5):587–92.
 42. Spits H, Cupedo T. Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. *Annu Rev Immunol* 2012;30:647–75.
 43. Garrido-Mesa N, Algieri F, Rodriguez Nogales A, Galvez J. Functional plasticity of Th17 cells: implications in gastrointestinal tract function. *Int Rev Immunol* 2013;32(5–6):493–510.
 44. Zhang C, Zhao Z, Osman H, Watson R, Nalbantoglu I, Lin J. Differential expression of miR-31 between inflammatory bowel disease and microscopic colitis. *Microna* 2014;3(3):155–9.

RESUM DE RESULTATS I DISCUSSIÓ

GLOBAL

Back off man! I'm a scientist

Dr. Peter Venkman (Ghostbusters)

El sistema immune gastrointestinal ha de mantenir un balanç entre les respostes tolerogèniques i proinflamatòries per a mantenir la homeòstasi del sistema. La sobrecàrrega antigènica de la mucosa intestinal és diferent en funció de la localització intestinal, amb un predomini d'antígens procedents de la dieta al budell prim i de la microbiota al budell gruixut [1] i per tant és molt possible que la resposta immune mostri diferències entre diferents regions intestinals. Les diferències relacionades amb la localització a la mucosa intestinal humana sana i inflamada estan poc estudiades. Aquest coneixement és essencial quan s'estudien malalties que poden afectar a tot el tub digestiu, com la MCrohn. L'objectiu d'aquesta tesi doctoral ha estat determinar les diferències en la resposta immunitària efectora i reguladora relacionades amb la localització intestinal i com canvien aquests patrons en condicions d'inflamació intestinal de diferents tipus (MII, CI i CM).

Equilibri Th17/Treg a la mucosa sana

Hi ha molt pocs estudis que hagin avaluat la presència de subtipus de limfòcits T efectors (Th1 i Th17) o reguladors (Treg) o de les citocines produïdes per aquests a diferents localitzacions intestinals en condicions fisiològiques [21, 22, 179].

A la mucosa de còlon dret i esquerre es va detectar un increment significatiu de les cèl·lules Th17, tant de forma espontània (cultiu no estimulat) com després de la activació in vitro (cultiu amb PMA/Ionomicina/Brefeldina-A) en comparació amb l'íleum sa (estudi 1, figura 1 i figura suplementària 1). Respecte a Treg, s'ha detectat un lleu increment del percentatge d'aquest subtipus cel·lular a còlon dret respecte de còlon esquerre o ili terminal (estudi 1, figura 3). Aquests resultats corroboren els d'un estudi previ que també detecta un increment de la proporció de Th17 i Treg a còlon dret [21]. Aquest subtil increment simultani de cèl·lules efectores i reguladores és probablement degut a una "inflamació fisiològica" de baix grau com a conseqüència d'una major diversitat bacteriana, especialment a cec.

L'estudi d'expressió gènica (nivells de mRNA a teixit) no es correspon amb les troballes a nivell cel·lular, ja que no s'han trobat diferències significatives entre les tres regions en IL-17-A (principal citocina Th17) ni en FOXP3 (factor de transcripció fonamental per a Treg) (estudi 1, figura 3 i figura suplementària 1).

A diferència de les troballes descrites per a Th17 i Treg, no s'ha detectat cap canvi significatiu ni en percentatge de cèl·lules Th1, ni en l'expressió gènica d'IFN- γ , en les tres regions intestinals avaluades (estudi 1, figura suplementària 1). Aquests resultats confirmen els d'altres estudis [21],

El nostre estudi demostra que existeix un delicat equilibri entre els mecanismes efectors (Th17) i reguladors (Treg) a la mucosa intestinal sana, que es troben simultàniament incrementats al còlon. Les cèl·lules Th17 protegeixen la mucosa de microorganismes que penetren l'epiteli i contribueixen a mantenir la integritat de la funció barrera, mentre que les Treg inhibeixen una excessiva proliferació de cèl·lules efectores i eviten la exacerbació de la inflamació. El balanç entre ambdós subtipus probablement contribueix al manteniment de la homeostàsi intestinal, en un procés de canvi i reajustament continuat, conegut com "inflamació fisiològica". De fet, tant Treg com Th17 requereixen els mateixos factors per a la seva diferenciació (TGF- β i IL-6) [180] i tots dos es veuen modulats per components procedents de la microbiota[181]. La decisió de diferenciar des de cèl·lula *naïve* cap a un o altre subtipus depèn principalment de TGF- β , que actua de manera dosi-dependent (concentracions elevades afavoreixen Treg i concentracions menors afavoreixen Th17)[182]. A més, un cop diferenciades cap a un o altre fenotip, els fenòmens de plasticitat cel·lular, estretament regulats pels mediadors de la inflamació presents a l'ambient, permeten l'intercanvi de fenotips (de Treg \rightarrow Th17 i *viceversa*) el que permet mantenir en tot moment una resposta adequada a uns antígens ambientals en canvi permanent [183].

En condicions d'inflamació els patrons Th1/Th17 són específics de malaltia

No hi ha estudis que hagin avaluat si les diferències detectades en mucosa sana (increment de Treg a còlon dret i increment de Th17 a còlon en comparació a íleum) es mantenen en malalties que afectin a diferents segments del budell (MCrohn). Pel que fa a les malalties d'afectació exclusiva de còlon la informació al respecte és escassa i la majoria d'estudis es limiten a la mesura de l'expressió gènica, que tal com s'ha observat prèviament a la mucosa sana, no sempre correlaciona amb els nivells de subtipus cel·lulars productors. Per tant, es va avaluar simultàniament la presència de

les cèl·lules Th1, Th17 i Treg mitjançant citometria de flux i l'expressió gènica de IFN, IL-17-A i FOXP3 mitjançant PCR en temps real a regions afectades d'inflamació activa de diferents patologies (MCrohn, CU, CI i MC).

Totes les formes d'inflamació intestinal sense excepció han mostrat un marcat increment dels nivells d'expressió gènica de IL-17-A i IFN- γ , independentment de la localització (estudi 1, figura 1). Pel que fa als nivells de cèl·lules Th1 i Th17, en canvi, els canvis han estat dependents de malaltia i independents de localització i no s'han produït en el mateix sentit que els observats per als nivells de mRNA (estudi 1, figura 1).

A la MCrohn s'ha detectat un increment d'ambós fenotips efectors, Th1 i Th17, sense diferència entre MCrohn ileal o de còlon. A la CU, en canvi, només s'ha detectat un increment de cèl·lules Th17, mentre que les Th1 s'han mantingut a nivells baixos comparables al de controls sans (estudi 1, figura 1). Aquests resultats corroboren estudis previs que relacionen la MCrohn amb un patró Th1/Th17 i la CU amb un patró Th17 [184]. La CI no ha presentat cap diferència amb els controls sans en les proporcions Th1 o Th17 de la mucosa de còlon (estudi 1, figura 1).

Curiosament, la CM s'ha comportat de manera exactament oposada a la MCrohn, amb una reducció significativa d'ambdós subtipus efectors (Th1 i Th17), i sense diferències entre CC i CL (estudi 1, figura 1 i estudi 2, figura 7). Alguns estudis havien suggerit que la CM està mediada per l'activació de les vies Th1/Th17, arrel dels resultats obtinguts per la mesura de l'expressió gènica de citocines relacionades amb aquests eixos [148, 150]. Ja s'ha esmentat anteriorment que en condicions fisiològiques no s'ha detectat relació entre subtipus cel·lulars i l'expressió gènica de determinades molècules produïdes per aquests tipus cel·lulars. Arrel d'aquesta discrepància es va decidir ampliar el nombre de citocines estudiades de l'eix Th1 (IFN- γ i TNF- α) i Th17 (IL-17-A, IL-21 i IL-23) i mesurar-ne no tan sols l'expressió gènica sinó també els nivells de proteïna total en teixit. Els nivells de proteïna total no van mostrar les diferències observades per a l'expressió gènica. En aquest sentit, en general, no es va trobar cap diferència entre els dos grups de CM (CC i CL) i els controls sans per a cap citocina, excepte per a IFN- γ que va mostrar nivells discretament inferiors a la CC que

als controls sans (estudi 2, figura 8). La evident manca de correlació entre els nivells de RNA i proteïna obliga a l'avaluació simultània d'ambdós paràmetres per a evitar arribar a conclusions errònies. El procés de transcripció d'RNA a proteïna es veu regulat per múltiples factors, com la vida mitja i l'estabilitat dels RNA, la presència de miRNA inhibidors o la presència d'enzims degradants d'RNA[185]. D'altra banda, encara que alguns tipus cel·lulars produeixen majoritàriament un tipus concret de citocina, la producció d'una citocina no és exclusiva d'un tipus cel·lular concret. Per tant aquells estudis que han extret conclusions sobre la fisiopatologia d'algunes malalties basant-se exclusivament en l'anàlisi de l'expressió gènica s'haurien de revisar.

L'increment de Treg és un marcador inespecífic d'inflamació crònica intestinal

Totes les formes d'inflamació intestinal avaluades (MCrohn ileal i de còlon, CU i CM) han mostrat un increment de cèl·lules Treg (mesurat per citometria de flux i per immunohistoquímica) i de l'expressió gènica de FOXP3 (mesurat per PCR en temps real). La única forma d'inflamació a on no s'ha detectat una diferència significativa (tot i que si presenta una tendència a una major presència de Treg i expressió de FOXP3) és la CI (estudi 1, figura 3 i 4). En aquest cas, i a diferència de les citocines de l'eix Th1/Th17, sí que hi ha una bona correlació entre els nivells de mRNA, de proteïna en teixit i de cèl·lules mesurades per citometria. De fet, encara que ja s'havia descrit prèviament l'increment de Treg teixit a la MII [67] i a la CM [141, 143, 144], per primera vegada s'han avaluat simultàniament els valors de Treg i els nivells de FOXP3 (mRNA i proteïna), demostrant la bona correlació de les tres mesures. Per tant, al menys per a FOXP3, sí es podria fer una sola mesura aïllada sense necessitat de confirmació amb altres mètodes.

Altres estudis del nostre grup que avaluen la presència de Treg en altres regions intestinals no incloses en aquesta tesi (duodè) suggereixen que l'increment inespecífic de Treg no es limita a la inflamació ileo-còlica. Pacients amb MCrohn o CM amb mucosa duodenal normal (Marsh 0) o amb un mínim infiltrat limfocitari (Marsh 1), pacients amb atròfia induïda per olmesartan, i pacients celíacs també presenten

aquest increment de Treg (manuscrit en preparació), corroborant la inespecificitat de l'increment d'aquest tipus cel·lular.

Sembla paradoxal que la mucosa persisteixi inflamada malgrat l'augment de cèl·lules Treg que teòricament haurien de suprimir aquesta inflamació. Per tant o bé aquestes cèl·lules tenen una funcionalitat alterada (pèrdua de la capacitat reguladora) o bé es troben bloquejades per altres mecanismes (per exemple, en celiaquia les Treg són perfectament funcionals però es troben inhibides per la acció de la IL-15 [186]) o bé no són capaces de contrarestar els fenòmens d'inflamació exacerbada. Els mecanismes pels quals l'excés de Treg no és capaç de revertir la inflamació són probablement diferents a cada malaltia. Estudis in vitro demostren que a la MCrohn la funcionalitat de les Treg no difereix en absolut de la controls sans, és a dir les Treg tenen el potencial d'inhibició preservat [187]. Les cèl·lules Treg poden ser originades directament a timus (Treg naturals, nTreg) o diferenciades a teixit (Treg induïdes, iTreg). Les iTreg preserven la capacitat de síntesi de citocines proinflamàtòries, mentre que les nTreg no. En aquest sentit, a la MCrohn s'ha reportat repetidament la presència de cèl·lules Treg amb capacitat de síntesi de citocines proinflamàtòries IL-17 [70, 188], suggerint una plasticitat Th17-Treg amb tendència a mantenir els factors proinflamatoris sobre els reguladors. A més l'expressió de FOXP3 intracel·lular es pot veure incrementada de manera inespecífica i transitòria en cèl·lules no-Treg per múltiples factors, com per exemple el grau d'activació o la densitat cel·lular [189]. Per tant és possible que s'estigui sobreestimant la presència de Treg i l'increment de cèl·lules FOXP3+ sigui, al menys a la MCrohn, promotor de la inflamació en comptes de supressor[190]. Seria aconsellable per tant considerar en futurs estudis les diferències funcionals d'aquest subtipus cel·lular entre malalties a on les Treg clarament no poden frenar la inflamació (MCrohn) en comparació amb formes d'inflamació menys greu (CM) a on probablement aquestes sí podrien jugar un paper beneficiós. Així es podria determinar si la cronicitat i la gravetat de la malaltia està o no relacionada amb la funcionalitat d'aquestes cèl·lules.

Major freqüència de limfòcits Doble Positius CD3⁺CD4⁺CD8⁺ a l'íleum sa i inflammat

Els limfòcits Doble Positius CD3⁺CD4⁺CD8⁺ (DP) són un subtipus dels coneguts com limfòcits atípics, dels quals se'n desconeix la distribució i la funcionalitat a la mucosa intestinal sana i inflamada. Els nostres resultats demostren que són molt més freqüents a l'ili en comparació amb el còlon, tant en mucosa sana (p=0.003) com en MCrohn (p=0.016). És remarcable que a cap de les formes d'inflamació de còlon avaluades (llevat de la CL) s'han detectat diferències en vers la mucosa de còlon sana, suggerint que les cèl·lules DP es veuen poc alterades en condicions d'inflamació i probablement no tenen un paper en la fisiopatologia de les malalties inflamatòries intestinals avaluades (estudi 1, figura 2).

Per contra, a la CL (però no a la CC) sí s'ha detectat una discreta reducció en el percentatge de cèl·lules DP en comparació amb còlon sa (p=0.047) (estudi 2, figura 4). Altres estudis, en canvi, van detectar un discret increment de DP a CC (però no a CL)[142], i en pacients amb síndrome de còlon irritable post infeccions [191]. Aquestes discrepàncies es poden explicar per les diferències en els criteris d'inclusió dels pacients, en la metodologia d'aïllament cel·lular o en la metodologia de detecció de DP. A més, existeix la possibilitat de que sota el fenotip CD3⁺CD4⁺CD8⁺ s'amaguin diferents subtipus cel·lulars, el que explicaria en part les discrepàncies entre els estudis.

Els DP es poden subdividir en dues categories: els que expressen el CD8 convencional (CD8 $\alpha\beta$) i els que expressen CD8 $\alpha\alpha$. Els primers presenten un fenotip citotòxic molt agressiu, expressen perforina i CD56 [192], mentre que els segons presenten un fenotip immunoregulador i secreten IL-10 [11]. El segon subtipus (CD8 $\alpha\alpha$) presenta localització intraepitelial al budell, respon a *Fecalobacterium prausnitzii* i es troba reduït a sang i mucosa de pacients amb MII [11]. Malauradament la majoria d'estudis, inclòs aquest mateix, no han avaluat la presència de CD8 $\alpha\alpha$ o CD8 $\alpha\beta$ a les cèl·lules DP [8], el que dificulta encara més la interpretació de les troballes del nostre estudi.

Els limfòcits Doble Negatiu CD3⁻CD4⁻CD8⁻ podrien tenir un paper en la fisiopatologia d'algunes malalties inflamatòries intestinals

Els limfòcits doble negatiu (DN) formen part juntament amb els DP dels coneguts com limfòcits atípics, dels quals no es coneix ni la distribució al tracte digestiu ni la funcionalitat a mucosa sana o inflamada [1].

A mucosa sana, la distribució de DN és especular a la descrita per DP, essent molt abundants al còlon i molt poc presents a íleum ($p=0.002$) (estudi 1, figura suplementària 3). A més del patró dependent de localització descrit per a la mucosa sana, també s'han trobat dos patrons específics de malaltia: les DN es troben molt incrementades a la CM ($p=0.04$) i molt reduïdes a la MCrohn de còlon ($p=0.003$). Les DN a la CM i a la MCrohn es comporten en sentit oposat (especular) a les Th1/Th17, i podrien ser importants en la fisiopatologia d'aquestes malalties. A les altres formes d'inflamació intestinal de còlon avaluades (CU i CI), ni tampoc a la MCrohn ileal, no s'han detectat patrons específics de malaltia, i els resultats obtinguts no difereixen dels detectats per a mucosa sana (estudi 1, figura 2).

Els resultats obtinguts són remarcables, però per a poder-los interpretar adequadament cal aprofundir en l'avaluació fenotípica i funcional de les cèl·lules DN. Sota el fenotip CD3⁻CD4⁻CD8⁻ s'engloben, a més de DN, múltiples subtipus cel·lulars, com les cèl·lules TCR- $\gamma\delta^+$, MAIT, NK-T, etc.

Pel que respecta a la funcionalitat, tampoc està clar quin paper poden jugar les DN a la mucosa humana. Estudis en ratolins demostren que les cèl·lules DN intestinals intraepiteliais formen un llinatge cel·lular únic, generat al timus, amb un patró de restricció MHC divers i poc convencional, que no solapa amb els patrons MHC convencionals (de CD4⁺ o CD8⁺) i per tant reconeixen antígens que els limfòcits convencionals no són capaços de detectar[193]. Per contra, altres estudis en models murins demostren que és possible generar in vitro cèl·lules DN a partir de cèl·lules T CD4⁺ convencionals hiper-estimulades imitant l'ambient que es produiria en condicions d'inflamació. Aquestes cèl·lules DN generades in vitro tenen un fenotip efector i una

taxa de proliferació molt elevada[194]. Actualment no tenim dades que ens puguin orientar cap a quin dels dos escenaris ens trobem a la mucosa humana inflamada. És imprescindible investigar en profunditat l'origen, el fenotip i la funcionalitat de les cèl·lules DN intestinals humanes potencialment implicades en la MCrohn i la CM per a comprendre la fisiopatologia d'aquestes malalties.

L'aclariment de limfòcits per apoptosi s'incrementa en sentit distal a la mucosa intestinal sana

La inducció de la mort cel·lular programada (apoptosi) és un dels mecanismes del sistema immunitari per a controlar la quantitat de cèl·lules efectores. Aquest procés es particularment important en regions amb una estimulació antigènica continuada, com el tracte gastrointestinal, i evita una proliferació excessiva que conduiria a una inflamació descontrolada. De fet, en individus sans, els limfòcits de LP presenten una taxa d'apoptosi més elevada (espontània i induïda per activació de CD2) conjuntament amb una menor resposta a estímuls proliferatius (activació TCR/CD3)[71]. Es considera que tots dos factors (menor proliferació i major apoptosi) contribueixen a mantenir l'homeòstasi intestinal. S'ha suggerit a més que alteracions en els mecanismes d'apoptosi podrien ser essencials en la fisiopatologia de malalties intestinals, especialment a la MCrohn [195], i fins i tot que la seva mesura podria ser un bon factor predictiu de resposta a tractaments[84].

Sorprenentment, i malgrat la gran importància d'aquest fenomen, i el potencial ús clínic de la mesura de la taxa d'apoptosi, mai s'havia dut a terme un estudi comparatiu de les taxes de mort cel·lular en diferents compartiments intestinals.

En el nostre estudi, es va avaluar la taxa d'apoptosi de limfòcits mitjançant tres mètodes independents: mesura de l'expressió intracel·lular de Caspasa-3 (per citometria de flux i immunohistoquímica) i mesura de l'expressió de d'Annexina-V a membrana per citometria de flux. L'avaluació conjunta d'Annexina-V amb un colorant vital (en el nostre cas 7-AAD) permet determinar els diferents estadis del procés apoptòtic (apoptosi precoç/tardana i necrosi). A la mucosa sana, els nivells d'apoptosi precoç i tardana de limfòcits CD3⁺, CD3⁻ i CD3⁺CD4⁺ s'incrementen en sentit distal (ili<còlon dret<còlon esquerre). Per als limfòcits CD3⁺CD8⁺ es manté la mateixa

tendència, malgrat els resultats són menys prominents, suggerint que el mecanisme d'aclariment per mort cel·lular és més important per a les poblacions efectores (CD4⁺) en vers les citotòxiques (CD8⁺). Les tres tècniques emprades han aportat resultats complementaris i reforcen la validesa de les nostres observacions (estudi 1, figura 5 i 6).

S'ha reportat en aquest estudi per primera vegada que hi ha variacions en la taxa d'apoptosi de limfòcits en funció de la localització a l'intestí, essent gairebé inexistent a íleon i augmentant en sentit distal en còlon. Aquests resultats són especialment importants per a interpretar els resultats obtinguts en malalties que poden afectar tot el tracte digestiu, com la MCrohn.

Tots els tipus d'inflamació del còlon, incloent les formes més lleus, presenten una menor apoptosi en comparació amb el còlon sa

Totes les formes d'inflamació de còlon avaluades (MCrohn, CU, CI i CM) presenten una marcada reducció de la apoptosi tardana, nivells intracel·lulars de caspasa-3 activada i dels nivells de necrosi (cèl·lules mortes) en comparació amb la mucosa de còlon sana. En canvi, els nivells d'apoptosi precoç (Annexina-V⁺/7-AAD⁻) en les mostres d'inflamació intestinal o bé no presenten canvis o fins i tot es troben incrementats en comparació a la mostra sana (estudi 1, figura 7). Aquesta primera fase de la apoptosi és reversible i l'increment d'Annexina-V pot representar alteracions transitòries de la membrana plasmàtica que reverteixen sense culminar el procés de mort cel·lular. Els nostres resultats corroboren estudis previs que ja havien demostrat repetidament que múltiples malalties inflamatòries intestinals comparteixen aquest mecanisme de resistència a la mort cel·lular programada [80-82]. Per primera vegada s'ha demostrat que aquesta resistència a la apoptosi característica de teixits inflamats també afecta a la CM, que en aquest sentit es comporta igual que les formes d'inflamació més greus (estudi 1, figura 7).

La taxa d'apoptosi de limfòcits a la Malaltia de Crohn depèn de la localització de la inflamació

Ja s'ha mencionat a l'apartat previ que la MCrohn de còlon es comporta exactament igual que qualsevol altre tipus d'inflamació, amb nivells d'apoptosi molt inferiors als que es detecten en una mucosa sana. La MCrohn ileal, en canvi, no es comporta igual. Els nivells de caspasa-3 activada són significativament superiors a les mostres de MCrohn en comparació amb l'íleum sa, tant en nivells totals ($p=0.016$) com en limfòcits T ($p=0.027$). S'ha detectat també una tendència no significativa a una major taxa d'apoptosi precoç i tardana de limfòcits T, Th i Tc en la MCrohn ileal (estudi 1, figura 7).

La majoria d'estudis que han avaluat l'apoptosi a la MCrohn no han tingut en compte la localització de les mostres [73, 83]. A més, s'ha suggerit que aquesta mesura pot ser un bon biomarcador de bona resposta terapèutica [84, 85]. El nostre estudi demostra que hi ha grans diferències en els mecanismes de regulació per apoptosi tant a la mucosa sana com a la MCrohn, i per tant és essencial tenir en compte la procedència topogràfica de mostres i controls per a poder establir la seva utilitat com a biomarcador.

Els patrons específics de malaltia no es veuen reflectits a sang perifèrica

Els tipus cel·lulars estudiats en aquesta tesi es van avaluar simultàniament a sang perifèrica i a mucosa intestinal. Cap dels patrons associats a malaltia es va trobar reflectit en sang perifèrica (PBMC) (estudi 1, figura suplementària 2 i 5). Només en el cas de la MCrohn, es va detectar una davallada de cèl·lules DN en sang ($p=0.042$), independentment de la localització de la malaltia. Aquest fet ja havia estat prèviament descrit en altres estudis i es va atribuir a les cèl·lules MAIT [196]. Aquesta troballa és important i mereix ser explorada en profunditat, no només des d'un punt de vista fisiopatològic, sinó també com a eventual biomarcador per a la MCrohn.

Donat que ni les diferències dependents de localització ni la majoria de diferències dependents de tipus de malaltia es veuen reflectides en sang perifèrica, cal

plantejar quin és l'origen de les diferències detectades al budell sa i inflammat. Hi ha dues possibilitats, no excloents entre sí: un reclutament selectiu de precursors sanguinis a teixit, determinat pel el patró d'expressió de molècules de homing en limfòcits circulants i de quimiocines a teixit o bé un mecanisme de diferenciació cel·lular programat al mateix teixit a partir de precursors preexistents. Convé realitzar estudis funcionals per aclarir aquest aspecte, que pot ser de gran rellevància per a comprendre la fisiopatologia d'algunes malalties inflamatòries intestinals i pot obrir pas a la trobada de noves dianes terapèutiques.

La colitis microscòpica presenta un bloqueig dels mecanismes proinflamatoris

Les dues formes de presentació de la CM (CC i CL) presenten múltiples mecanismes comuns a altres formes d'inflamació intestinal més greus (MII), i que s'han comentat als apartats previs, com la davallada de la taxa d'apoptosi dels limfòcits de LP, l'increment de cèl·lules Treg CD25⁺FOXP3⁺, o l'augment de la cel·lularitat total (estudi 2, taula 2). Malgrat la presència d'aquests processos característics del procés inflamatori, la inflamació a la CM es manté autolimitada i molt rarament desenvolupa alteracions macroscòpiques (i si ho fa, aquestes són mínimes, en forma d'edema, eritema o canvis vasculars[197]). A més, tot i que hi ha una evident activació dels eixos proinflamatoris Th1 i Th17 (mesurat com a increment de l'expressió gènica de IFN- γ , IL-17-A, IL-21 i IL-23), aquesta resposta es troba bloquejada i inhibida, com es demostra amb la menor presència de cèl·lules Th1 i Th17 en comparació amb controls sans i amb un contingut total dels nivells de proteïnes dels gens sobre-expressats sense canvis rellevants en vers una mucosa sana (estudi 2, taula 2 i 3). Els nostres resultats concorden amb els de Wagner i col·laboradors [137] que van demostrar un menor grau d'activació de limfòcits (mesurat per l'expressió de CD69⁺) en pacients amb CC en comparació a controls, suggerint un bloqueig en l'activitat normal dels LPL que es normalitza amb el tractament amb budesonida.

És possible que aquest bloqueig de l'activitat dels limfòcits T estigui, al menys en part, mediat per la citocina anti-inflamatòria per excel·lència del budell: la IL-10 [198]. De fet, només a la CM es detecta un increment simultani de l'expressió gènica

de IL-10, dels nivells de proteïna total i dels nivells de IL-10 secretada en cultiu (estudi 2, figura 6). En altres formes d'inflamació intestinal (MCrohn, CU i CI), aquest fenomen no es produeix, es manifesta tan sols un increment de l'expressió gènica però els nivells totals de proteïna i els nivells de proteïna secretada en cultiu no varien en comparació amb controls sans (manuscrit en preparació). És per tant temptador especular que l'augment de IL-10 a nivell de proteïna pot ser el responsable de mantenir la inflamació de la CM a nivells microscòpics.

Aprofundir en el(s) mecanisme(s) de bloqueig de la resposta inflamatòria que eviten l'agreujament i exacerbació de la inflamació de la CM pot ser de gran importància per a altres patologies més greus (a on aquest "fre d'emergència" no funciona, com la MCrohn) i podria donar lloc a dianes terapèutiques que simulesin aquesta inhibició que manté la inflamació a nivells mínims.

Colitis col·làgena i colitis limfocítica: dues malalties molt relacionades però independents

La CM es va incloure inicialment a l'estudi 1 com un mer control d'inflamació intestinal sostinguda i poc greu. Durant la seva execució es van començar a intuir diferències rellevants entre els dos subtipus principals de CM (CC i CL), i es va considerar pertinent aprofundir en l'estudi de les similituds i diferències entre les dues condicions. A dia d'avui encara no hi ha consens a la comunitat científica sobre si són dues isoformes d'una mateixa malaltia o si constitueixen dues malalties totalment independents amb alguns trets comuns compartits [104, 163].

En el nostre estudi, hem pogut observar com alguns paràmetres, ja discutits en apartats previs, es comporten de manera idèntica en totes dues condicions (com l'increment de Treg i DN, la reducció de la apoptosi o la inhibició de l'eix Th1/Th17). En canvi, el perfil d'altres subtipus de limfòcits és completament diferent entre CC i CL. La CL presenta nivells superiors de limfòcits T totals ($CD3^+$, $p=0.001$), limfòcits T citotòxics ($CD3^+CD8^+$ $p=0.022$) i nivells inferior de limfòcits T helper ($CD3^+CD4^+$ $p=0.002$) en comparació als controls sans (estudi 2, taula 2), tots ells fenòmens prèviament descrits [142]. Curiosament, la CC no difereix dels controls sans en cap d'aquests paràmetres.

És remarcable que, malgrat no s'han trobat diferències en l'expressió de $\text{TCR}\alpha\beta^+$ i $\text{TCR}\delta\gamma^+$ en limfòcits T ($\text{CD}3^+$) o T citotòxics ($\text{CD}3^+\text{CD}8^+$) entre els tres grups, la CL presenta un destacable augment de limfòcits $\text{CD}4^+\text{TCR}\gamma\delta^+$ ($p=0.047$) (estudi 2, figura 2 i taula 2). Les cèl·lules $\text{TCR}\gamma\delta^+$ intraepitelials estan molt relacionades amb la fisiopatologia de la malaltia celíaca (tot i que en aquesta són de fenotip $\text{CD}8^+$ o $\text{CD}4^+\text{CD}8^-$)[199], el que ens va conduir a avaluar els nivells de IL-15 (citocina considerada desencadenant del dany a la mucosa a la celiaquia) [200] a la CM. Els resultats de l'expressió gènica de IL-15 estan en concordança amb l'increment de $\text{CD}4^+\text{TCR}\gamma\delta^+$, incrementada a CL ($p=0.002$) però no a CC en comparació amb mucosa sana (estudi 2, figura 3). En canvi, no es van detectar diferències en els nivells de IL-15 total (proteïna d'homogenat de biòpsia) entre els tres grups. Els nostres resultats suggereixen que un mecanisme fisiopatològic similar al de la malaltia celíaca (a on la IL-15 indueix in vitro un increment de limfòcits $\text{TCR}\gamma\delta^+$ intraepitelials)[201] podria estar actuant a la CL. De fet, patir malaltia celíaca és un factor de risc associat a CM[202, 203], i un estudi previ del nostre grup va determinar que existeix una associació entre CL i l'haplotip de risc de malaltia celíaca HLA-DQ2 [119]. Posteriorment un estudi amb 314 casos de CC i més de 4000 controls també va detectar i replicar una associació de l'HLA-DQ2.5 amb la CC [120].

Per a poder determinar si la CC i la CL són o no la mateixa entitat, és imprescindible estudiar-les simultàniament. En aquest sentit, hi ha molts estudis que només han estudiat una de les dues patologies, essent la CC la millor coneguda, a diferència de la CL, de la qual s'han fet menys estudis. Sovint s'assumeix que els trets fisiopatològics o la resposta clínica als tractaments observats en un dels dos subtipus de CM ha de ser extrapolable a l'altre, i no necessàriament és així. El nostre estudi, que inclou els dos grups principals de CM, i que ha comptat amb la inestimable ajuda d'un patòleg expert en la matèria (A. Salas) per al diagnòstic, posa èmfasi en les diferències remarcables existents entre ambdues malalties i reforça la necessitat de incloure tots dos grups sempre als estudis relacionats amb CM.

Limitacions de l'estudi

La mida mostral de cadascun dels grups avaluats en aquesta tesi és baixa, i per tant convé ser prudent en la interpretació de resultats. També s'ha comentat repetidament que l'ús d'un citòmetre de només 4 colors (FACS-Calibur) no ha permès fer un estudi fenotípic exhaustiu dels subtipus cel·lulars d'interès. Propers estudis del nostre grup permetran dur a terme aquests estudis necessaris amb metodologies més complexes (LSR-Fortessa i FACS-Aria) per a caracteritzar millor les poblacions de limfòcits atípics DP i DN.

Els estudis d'expressió gènica per PCR a temps real i la quantificació de proteïnes per ELISA s'han realitzat amb mostres procedents d'homogenats de biòpsia completa. Aquesta aproximació permet veure canvis molt evidents (com per exemple l'increment de IL-10 a nivell d'RNA i proteïna a la CM) però no permet detectar diferències més subtils, que quedarien diluïdes. Per exemple, en el nostre estudi no hem detectat canvis en els nivells d'expressió gènica o proteica del TGF- β a la CM[204] a nivell de la totalitat de la biòpsia, en canvi, altres autors han determinat per hibridació in situ i immunohistoquímica, un increment d'aquest factor de transcripció que és exclusiu dels eosinòfils a pacients de CC [136]. Per tant, canvis subtils o limitats a algunes poblacions cel·lulars minoritàries de la mucosa són difícilment detectables quan s'analitza la totalitat de la biòpsia. En aquest sentit seria de gran interès per al coneixement de la fisiopatologia de la CM determinar a quines línies cel·lulars correspon l'augment de l'expressió gènica dels marcadors de la via Th1/Th17 mitjançant estudis de PCR sobre cèl·lules aïllades per sorting. D'aquesta manera es podria determinar si hi ha un bloqueig real d'aquest eix (expressió a cèl·lules CD4+) o si corresponen a altres línies independents (expressió a macròfags o ILC).

A l'estudi de la fisiopatologia de la colitis microscòpica (estudi 2) convé assenyalar que el grup control és més jove que el grup CL (15 anys) i presenta un major percentatge d'homes que el grup CC (60% vs 7%). Tot i que no es van detectar diferències significatives en edat i sexe entre els tres grups, cal tenir present que són dos factors habitualment ignorats però que influeixen en l'immunofenotip de la mucosa intestinal i que potencialment podrien esbiaixar els resultats. En població sana,

les dones presenten majors nivells d'activació i de proliferació dels limfòcits jejunals i de sang perifèrica, i major expressió gènica de gens relacionats amb l'eix Th17 en comparació amb homes [205]. En el nostre cas, CC (amb predomini femení) i CL (amb una distribució de sexes quasi idèntica als controls del nostre estudi) es comporten igual en quant a l'expressió de citocines de l'eix Th1 i Th17, suggerint que el sexe no ha modificat els nostres resultats. Pel que fa a l'edat, durant la senescència es produeix un augment de cèl·lules NK i un destacable declivi de limfòcits T i B, tant en perifèria[206] com en mucosa intestinal [207]. En el nostre estudi no s'ha detectat aquesta tendència, i de fet, el grup més envellit (CL) és el que més limfòcits T ($CD3^+$ i $CD3^+CD8^+$) presenta a la mucosa. Kumawat i col·laboradors tampoc van detectar els patrons característics de l'edat (augment del grau d'activació cel·lular i reducció del nombre de cèl·lules naïve) en els pacients amb CC i CL en el seu estudi publicat al 2013 [142]. Sembla per tant que el patró inflamatori característic de la CM sobrepasa les diferències, més subtils, provocades per edat i sexe, de la mateixa manera com els canvis característics de la MC activa (increment Th17 i Treg) sobrepassen les petites diferències determinades per la compartimentalització intestinal de la mucosa sana.

Finalment, aquesta tesi és purament descriptiva, mostra una "fotografia" estàtica d'uns determinats subtipus cel·lulars en una localització intestinal determinada en condicions de salut i de malaltia, el que ha permès descriure "patrons" dependents de localització i de tipus d'inflamació. No s'ha realitzat cap estudi mecanicista que permeti esbrinar quines són les causes de les diferències observades. En aquest sentit hauria estat de gran interès analitzar les zones no inflamades en pacients amb MII o CI i mostres post-remissió en pacients amb CM per tal de determinar quines de les alteracions detectades són permanents i quines transitòries, per a comprendre millor la fisiopatologia de cadascuna d'aquestes malalties.

CONCLUSIONS

Extraordinary claims require extraordinary evidence.

Carl Sagan

Cosmos, episode 12, "Encyclopaedia Galactica"

1. El perfil de limfòcits efectors (Th1, Th17) i reguladors (Treg) varia al llarg dels diferents compartiments de l'intestí sa. L'augment de Treg es limita al còlon dret mentre que l'augment de Th17 es manifesta a tot el còlon. En condicions d'inflamació, l'augment de Treges molt remarcable i es detecta a totes les formes d'inflamació i a tots els compartiments intestinals, diluint les subtils diferències entre compartiments que es detecten a la mucosa intestinal sana. En canvi, el perfil de cèl·lules efectores és específic de cada malaltia inflamatòria intestinal (increment de Th1 i Th17 al Crohn, increment de Th17 a la colitis ulcerosa i reducció de Th1 i Th17 a la colitis microscòpica).

2. Els limfòcits DP es troben incrementats a l'ílium en comparació al còlon. Aquest patró de distribució es manté també en malalties inflamatòries.

3. Els limfòcits DN es troben incrementats al còlon en comparació a l'ílium a la mucosa sana. Aquestes cèl·lules es troben reduïdes a la malaltia de Crohn de còlon i incrementades a la colitis microscòpica i per tant podrien ser rellevants en la patologia de les malalties inflamatòries intestinals.

4. Els canvis detectats a la mucosa intestinal inflamada no es veuen, en general, reflectits en sang perifèrica.

5. A la mucosa sana, els nivells d'apoptosi s'incrementen en sentit distal, essent màxims a còlon esquerre i gairebé indetectables a ílium. A la mucosa inflamada del còlon hi ha una reducció de l'apoptosi de limfòcits, independentment del tipus de malaltia inflamatòria intestinal. Els nivells d'apoptosi de la malaltia de Crohn depenen de la localització de la inflamació. La malaltia de Crohn de còlon presenta una reducció de l'apoptosi, com qualsevol altre tipus d'inflamació, mentre que la malaltia de Crohn ileal presenta nivells de mort cel·lular superior a la de la mucosa ileal sana.

6. La CC i la CL comparteixen alguns mecanismes fisiopatològics. La inhibició de la resposta proinflamatòria Th1/Th17 i l'augment de la resposta reguladora (Treg i IL-10) podrien contribuir al control de la inflamació i prevenir l'aparició de dany macroscòpic.

7. Les cèl·lules DN podrien ser rellevants a la fisiopatologia de la CM, i es troben incrementades a la mucosa intestinal de les dues formes de presentació de la malaltia, CC i CL.

8. La CC i la CL difereixen en alguns mecanismes fisiopatològics. L'alteració del perfil limfocitari de la mucosa (definit per un increment de $CD8^+$ i una reducció de $CD4^+$ i DP) és exclusiu de la CL.

9. La CL presenta un increment de cèl·lules $CD4^+TCR\gamma\delta^+$ i un increment de l'expressió gènica de IL-15, suggerint que presenta mecanismes fisiopatològics similars als de la malaltia celíaca.

BIBLIOGRAFIA

What an astonishing thing a book is. Writing is perhaps the greatest of human inventions, binding together people who never knew each other. A book is proof that humans are capable of working magic.

Carl Sagan

Cosmos, episode 11, "The Persistence of Memory"

1. Mowat, A.M. and W.W. Agace, *Regional specialization within the intestinal immune system*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(10): p. 667-85.
2. Artis, D., *Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(6): p. 411-20.
3. Liang, S.C., et al., *Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides*. J Exp Med, 2006. **203**(10): p. 2271-9.
4. Kinugasa, T., et al., *Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators*. Gastroenterology, 2000. **118**(6): p. 1001-11.
5. Konkkel, J.E. and W. Chen, *Balancing acts: the role of TGF- β in the mucosal immune system*. Trends Mol Med, 2011. **17**(11): p. 668-76.
6. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
7. Sun, C.M., et al., *Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1775-85.
8. Parel, Y. and C. Chizzolini, *CD4⁺ CD8⁺ double positive (DP) T cells in health and disease*. Autoimmun Rev, 2004. **3**(3): p. 215-20.
9. Pahar, B., A.A. Lackner, and R.S. Veazey, *Intestinal double-positive CD4⁺CD8⁺ T cells are highly activated memory cells with an increased capacity to produce cytokines*. Eur J Immunol, 2006. **36**(3): p. 583-92.
10. Das, G., et al., *An important regulatory role for CD4⁺CD8⁺ alpha alpha T cells in the intestinal epithelial layer in the prevention of inflammatory bowel disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(9): p. 5324-9.
11. Sarrabayrouse, G., et al., *CD4⁺CD8⁺alphaalpha lymphocytes, a novel human regulatory T cell subset induced by colonic bacteria and deficient in patients with inflammatory bowel disease*. PLoS Biol, 2014. **12**(4): p. e1001833.
12. Fischer, K., et al., *Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta⁺ CD4⁻CD8⁻ double-negative regulatory T cells*. Blood, 2005. **105**(7): p. 2828-35.
13. Macfarlane, G.T. and L.E. Macfarlane, *Acquisition, evolution and maintenance of the normal gut microbiota*. Dig Dis, 2009. **27 Suppl 1**: p. 90-8.
14. Wang, Y., et al., *Regional mucosa-associated microbiota determine physiological expression of TLR2 and TLR4 in murine colon*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13607.
15. Johansson, M.E., H. Sjovall, and G.C. Hansson, *The gastrointestinal mucus system in health and disease*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013. **10**(6): p. 352-61.
16. Pelaseyed, T., et al., *The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system*. Immunol Rev, 2014. **260**(1): p. 8-20.
17. Carrasco, A., et al., *Comparison of lymphocyte isolation methods for endoscopic biopsy specimens from the colonic mucosa*. J Immunol Methods, 2013. **389**(1-2): p. 29-37.

18. Kagnoff, M.F., *Current concepts in mucosal immunity. III. Ontogeny and function of gamma delta T cells in the intestine*. Am J Physiol, 1998. **274**(3 Pt 1): p. G455-8.
19. Mann, E.R., et al., *Compartment-specific immunity in the human gut: properties and functions of dendritic cells in the colon versus the ileum*. Gut, 2015.
20. Bernardo, D., et al., *Chemokine (C-C Motif) Receptor 2 Mediates Dendritic Cell Recruitment to the Human Colon but Is Not Responsible for Differences Observed in Dendritic Cell Subsets, Phenotype, and Function Between the Proximal and Distal Colon*. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2016. **2**(1): p. 22-39.e5.
21. Wolff, M.J., et al., *TH17, TH22 and Treg cells are enriched in the healthy human cecum*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41373.
22. Tauschmann, M., et al., *Distribution of CD4(pos) -, CD8(pos) - and regulatory T cells in the upper and lower gastrointestinal tract in healthy young subjects*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e80362.
23. Marsal, J. and W.W. Agace, *Targeting T-cell migration in inflammatory bowel disease*. J Intern Med, 2012. **272**(5): p. 411-29.
24. Silverberg, M.S., et al., *Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology*. Can J Gastroenterol, 2005. **19 Suppl A**: p. 5-36.
25. Sostegni, R., et al., *Review article: Crohn's disease: monitoring disease activity*. Aliment Pharmacol Ther, 2003. **17 Suppl 2**: p. 11-7.
26. Dignass, A., et al., *The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management*. J Crohns Colitis, 2010. **4**(1): p. 28-62.
27. Van Assche, G., et al., *The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Special situations*. J Crohns Colitis, 2010. **4**(1): p. 63-101.
28. Sandborn, W.J., et al., *Vedolizumab as induction and maintenance therapy for Crohn's disease*. N Engl J Med, 2013. **369**(8): p. 711-21.
29. Buruiana, F.E., I. Sola, and P. Alonso-Coello, *Recombinant human interleukin 10 for induction of remission in Crohn's disease*. Cochrane Database Syst Rev, 2010(11): p. Cd005109.
30. Markowitz, J., et al., *A multicenter trial of 6-mercaptopurine and prednisone in children with newly diagnosed Crohn's disease*. Gastroenterology, 2000. **119**(4): p. 895-902.
31. Panes, J., et al., *Early Azathioprine Therapy is no More Effective Than Placebo for Newly Diagnosed Crohn's Disease*. Gastroenterology, 2013.
32. Cosnes, J., et al., *Early Administration of Azathioprine vs Conventional Management of Crohn's Disease: a Randomized Controlled Trial*. Gastroenterology, 2013.
33. Colombel, J.F., et al., *Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease*. N Engl J Med, 2010. **362**(15): p. 1383-95.
34. Baert, F., et al., *Mucosal healing predicts sustained clinical remission in patients with early-stage Crohn's disease*. Gastroenterology, 2010. **138**(2): p. 463-8; quiz e10-1.

35. Jarnerot, G., et al., *Infliximab as rescue therapy in severe to moderately severe ulcerative colitis: a randomized, placebo-controlled study*. *Gastroenterology*, 2005. **128**(7): p. 1805-11.
36. Message, L., et al., *Efficacy of intravenous cyclosporin in moderately severe ulcerative colitis refractory to steroids*. *Gastroenterol Clin Biol*, 2005. **29**(3): p. 231-5.
37. Laharie, D., et al., *Cyclosporin versus infliximab in patients with severe ulcerative colitis refractory to intravenous steroids: a parallel, open-label randomised controlled trial*. *Lancet*, 2012. **380**(9857): p. 1909-15.
38. Feagan, B.G., et al., *Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis*. *N Engl J Med*, 2013. **369**(8): p. 699-710.
39. de Souza, H.S. and C. Fiocchi, *Immunopathogenesis of IBD: current state of the art*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016. **13**(1): p. 13-27.
40. Loftus, E.V., Jr., *Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences*. *Gastroenterology*, 2004. **126**(6): p. 1504-17.
41. Roth, M.P., et al., *Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology*, 1989. **97**(4): p. 900-4.
42. Halme, L., et al., *Family and twin studies in inflammatory bowel disease*. *World J Gastroenterol*, 2006. **12**(23): p. 3668-72.
43. Jostins, L., et al., *Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease*. *Nature*, 2012. **491**(7422): p. 119-24.
44. Loddo, I. and C. Romano, *Inflammatory Bowel Disease: Genetics, Epigenetics, and Pathogenesis*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 551.
45. Petersen, C. and J.L. Round, *Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease*. *Cell Microbiol*, 2014. **16**(7): p. 1024-33.
46. Satokari, R., *Contentious host-microbiota relationship in inflammatory bowel disease--can foes become friends again?* *Scand J Gastroenterol*, 2015. **50**(1): p. 34-42.
47. Man, S.M., N.O. Kaakoush, and H.M. Mitchell, *The role of bacteria and pattern-recognition receptors in Crohn's disease*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011. **8**(3): p. 152-68.
48. Sokol, H., et al., *Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(43): p. 16731-6.
49. Norman, J.M., et al., *Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease*. *Cell*, 2015. **160**(3): p. 447-60.
50. Mukherjee, P.K., et al., *Mycobiota in gastrointestinal diseases*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015. **12**(2): p. 77-87.
51. Wehkamp, J., et al., *Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(50): p. 18129-34.
52. Buisine, M.P., et al., *Abnormalities in mucin gene expression in Crohn's disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 1999. **5**(1): p. 24-32.
53. Buisine, M.P., et al., *Mucin gene expression in intestinal epithelial cells in Crohn's disease*. *Gut*, 2001. **49**(4): p. 544-51.

54. Wehkamp, J., et al., *Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis*. *Inflamm Bowel Dis*, 2003. **9**(4): p. 215-23.
55. Johansson, M.E., et al., *Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis*. *Gut*, 2014. **63**(2): p. 281-91.
56. Gerlach, K., et al., *TH9 cells that express the transcription factor PU.1 drive T cell-mediated colitis via IL-9 receptor signaling in intestinal epithelial cells*. *Nat Immunol*, 2014. **15**(7): p. 676-86.
57. Fuss, I.J., et al., *Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis*. *J Clin Invest*, 2004. **113**(10): p. 1490-7.
58. Annunziato, F., et al., *Phenotypic and functional features of human Th17 cells*. *J Exp Med*, 2007. **204**(8): p. 1849-61.
59. Garrido-Mesa, N., et al., *Functional plasticity of Th17 cells: implications in gastrointestinal tract function*. *Int Rev Immunol*, 2013. **32**(5-6): p. 493-510.
60. Galvez, J., *Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Human IBD*. *ISRN Inflamm*, 2014. **2014**: p. 928461.
61. Monteleone, G., et al., *Interleukin-21 enhances T-helper cell type 1 signaling and interferon-gamma production in Crohn's disease*. *Gastroenterology*, 2005. **128**(3): p. 687-94.
62. Veny, M., et al., *Late Crohn's disease patients present an increase in peripheral Th17 cells and cytokine production compared with early patients*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2010. **31**(5): p. 561-72.
63. Zorzi, F., et al., *Distinct profiles of effector cytokines mark the different phases of Crohn's disease*. *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e54562.
64. Ban, H., et al., *Increased number of FoxP3+CD4+ regulatory T cells in inflammatory bowel disease*. *Mol Med Report*, 2008. **1**(5): p. 647-50.
65. Maul, J., et al., *Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology*, 2005. **128**(7): p. 1868-78.
66. Holmén, N., et al., *Functional CD4+CD25high regulatory T cells are enriched in the colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and increase with disease activity*. *Inflamm Bowel Dis*, 2006. **12**(6): p. 447-56.
67. Wang, Y., et al., *Expression of CD4+ forkhead box P3 (FOXP3)+ regulatory T cells in inflammatory bowel disease*. *J Dig Dis*, 2011. **12**(4): p. 286-94.
68. Reikvam, D.H., et al., *Increase of regulatory T cells in ileal mucosa of untreated pediatric Crohn's disease patients*. *Scand J Gastroenterol*, 2011. **46**(5): p. 550-60.
69. Chamouard, P., et al., *Diminution of Circulating CD4+CD25 high T cells in naïve Crohn's disease*. *Dig Dis Sci*, 2009. **54**(10): p. 2084-93.
70. Hovhannisyan, Z., et al., *Characterization of interleukin-17-producing regulatory T cells in inflamed intestinal mucosa from patients with inflammatory bowel diseases*. *Gastroenterology*, 2011. **140**(3): p. 957-65.
71. Boirivant, M., et al., *Stimulated human lamina propria T cells manifest enhanced Fas-mediated apoptosis*. *J Clin Invest*, 1996. **98**(11): p. 2616-22.

72. Ina, K., et al., *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): p. 1081-90.
73. Itoh, J., et al., *Decreased Bax expression by mucosal T cells favours resistance to apoptosis in Crohn's disease*. Gut, 2001. **49**(1): p. 35-41.
74. de Souza, H.S., et al., *Increased levels of survivin, via association with heat shock protein 90, in mucosal T cells from patients with Crohn's disease*. Gastroenterology, 2012. **143**(4): p. 1017-26.e9.
75. Tiede, I., et al., *CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes*. J Clin Invest, 2003. **111**(8): p. 1133-45.
76. ten Hove, T., et al., *Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease*. Gut, 2002. **50**(2): p. 206-11.
77. Shen, C., et al., *Adalimumab induces apoptosis of human monocytes: a comparative study with infliximab and etanercept*. Aliment Pharmacol Ther, 2005. **21**(3): p. 251-8.
78. Van den Brande, J.M., et al., *Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease*. Gastroenterology, 2003. **124**(7): p. 1774-85.
79. Nesbitt, A., et al., *Mechanism of action of certolizumab pegol (CDP870): in vitro comparison with other anti-tumor necrosis factor alpha agents*. Inflamm Bowel Dis, 2007. **13**(11): p. 1323-32.
80. Bu, P., et al., *Apoptosis: one of the mechanisms that maintains unresponsiveness of the intestinal mucosal immune system*. J Immunol, 2001. **166**(10): p. 6399-403.
81. Boirivant, M., et al., *Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis*, in *Gastroenterology*. 1999: United States. p. 557-65.
82. Doering, J., et al., *Induction of T lymphocyte apoptosis by sulphasalazine in patients with Crohn's disease*, in *Gut*. 2004: England. p. 1632-8.
83. Santaolalla, R., et al., *Apoptosis resistance of mucosal lymphocytes and IL-10 deficiency in patients with steroid-refractory Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(7): p. 1490-500.
84. Hlavaty, T., et al., *Predictive model for the outcome of infliximab therapy in Crohn's disease based on apoptotic pharmacogenetic index and clinical predictors*. Inflamm Bowel Dis, 2007. **13**(4): p. 372-9.
85. Van den Brande, J.M., et al., *Prediction of antitumour necrosis factor clinical efficacy by real-time visualisation of apoptosis in patients with Crohn's disease*. Gut, 2007. **56**(4): p. 509-17.
86. Cossu, A., et al., *"In vitro" azathioprine-induced changes in peripheral T cell apoptosis and IFN-gamma production associate with drug response in patients with Crohn's Disease*. J Crohns Colitis, 2013. **7**(6): p. 441-50.
87. Lindstrom, C.G., *'Collagenous colitis' with watery diarrhoea--a new entity?* Pathol Eur, 1976. **11**(1): p. 87-9.
88. Read, N.W., et al., *Chronic diarrhea of unknown origin*. Gastroenterology, 1980. **78**(2): p. 264-71.

89. Lazenby, A.J., et al., *Lymphocytic ("microscopic") colitis: a comparative histopathologic study with particular reference to collagenous colitis*. Hum Pathol, 1989. **20**(1): p. 18-28.
90. Benchimol, E.I., et al., *Collagenous colitis and eosinophilic gastritis in a 4-year old girl: a case report and review of the literature*. Acta Paediatr, 2007. **96**(9): p. 1365-7.
91. Camarero, C., et al., *Collagenous colitis in children: clinicopathologic, microbiologic, and immunologic features*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2003. **37**(4): p. 508-13.
92. Munch, A., et al., *Microscopic colitis: Current status, present and future challenges: statements of the European Microscopic Colitis Group*. J Crohns Colitis, 2012. **6**(9): p. 932-45.
93. Hjortswang, H., et al., *Defining clinical criteria for clinical remission and disease activity in collagenous colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(12): p. 1875-81.
94. Esteve, M., et al., *Efficacy of anti-TNF therapies in refractory severe microscopic colitis*. J Crohns Colitis, 2011. **5**(6): p. 612-8.
95. Fernández-Bañares, F., et al., *Collagenous and lymphocytic colitis. evaluation of clinical and histological features, response to treatment, and long-term follow-up*. Am J Gastroenterol, 2003. **98**(2): p. 340-7.
96. Yen, E.F., et al., *Decreased colorectal cancer and adenoma risk in patients with microscopic colitis*. Dig Dis Sci, 2012. **57**(1): p. 161-9.
97. Storr, M.A., *Microscopic colitis: epidemiology, pathophysiology, diagnosis and current management-an update 2013*. ISRN Gastroenterol, 2013. **2013**: p. 352718.
98. Fernández-Bañares, F., et al., *Epidemiological Risk Factors in Microscopic Colitis: A Prospective Case-Control Study*. Inflamm Bowel Dis, 2013. **19**(2): p. 411-417.
99. Vigren, L., et al., *Is smoking a risk factor for collagenous colitis?* Scand J Gastroenterol, 2011. **46**(11): p. 1334-9.
100. Yen, E.F., et al., *Current and past cigarette smoking significantly increase risk for microscopic colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2012. **18**(10): p. 1835-41.
101. Fernandez-Banares, F., et al., *Impact of current smoking on the clinical course of microscopic colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2013. **19**(7): p. 1470-6.
102. Munch, A., et al., *Smoking Status Influences Clinical Outcome in Collagenous Colitis*. J Crohns Colitis, 2015.
103. Pisani, L.F., et al., *Microscopic Colitis: What Do We Know About Pathogenesis?* Inflamm Bowel Dis, 2016. **22**(2): p. 450-8.
104. Rasmussen, M.A. and L.K. Munck, *Systematic review: are lymphocytic colitis and collagenous colitis two subtypes of the same disease - microscopic colitis?* Aliment Pharmacol Ther, 2012. **36**(2): p. 79-90.
105. Fernandez-Bañares, F., et al., *Bile acid malabsorption in microscopic colitis and in previously unexplained functional chronic diarrhea*. Dig Dis Sci, 2001. **46**(10): p. 2231-8.
106. Offner, F.A., et al., *Collagenous colitis: a study of the distribution of morphological abnormalities and their histological detection*. Hum Pathol, 1999. **30**(4): p. 451-7.
107. Thijs, W.J., et al., *Microscopic colitis: prevalence and distribution throughout the colon in patients with chronic diarrhoea*. Neth J Med, 2005. **63**(4): p. 137-40.

108. Tanaka, M., G. Mazzoleni, and R.H. Riddell, *Distribution of collagenous colitis: utility of flexible sigmoidoscopy*. Gut, 1992. **33**(1): p. 65-70.
109. Salas, A., et al., *Subepithelial myofibroblasts and tenascin expression in microscopic colitis*. Histopathology, 2003. **43**(1): p. 48-54.
110. Shaz, B.H., et al., *Sequential clinical and histopathological changes in collagenous and lymphocytic colitis over time*. Mod Pathol, 2004. **17**(4): p. 395-401.
111. Stewart, M.J., C.H. Seow, and M.A. Storr, *Prednisolone and budesonide for short- and long-term treatment of microscopic colitis: systematic review and meta-analysis*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2011. **9**(10): p. 881-90.
112. Munch, A., S. Ignatova, and M. Strom, *Adalimumab in budesonide and methotrexate refractory collagenous colitis*. Scand J Gastroenterol, 2012. **47**(1): p. 59-63.
113. Pardi, D.S., et al., *Treatment of refractory microscopic colitis with azathioprine and 6-mercaptopurine*. Gastroenterology, 2001. **120**(6): p. 1483-4.
114. Münch, A., et al., *Dynamics of mucosal permeability and inflammation in collagenous colitis before, during, and after loop ileostomy*. Gut, 2005. **54**(8): p. 1126-8.
115. Jarnerot, G., et al., *Collagenous colitis and fecal stream diversion*. Gastroenterology, 1995. **109**(2): p. 449-55.
116. Daferera, N., et al., *Fecal stream diversion and mucosal cytokine levels in collagenous colitis: A case report*. World J Gastroenterol, 2015. **21**(19): p. 6065-71.
117. Koskela, R.M., et al., *Cytokine gene polymorphism in microscopic colitis association with the IL-6-174 GG genotype*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2011. **23**(7): p. 607-13.
118. Koskela, R.M., et al., *Human leucocyte antigen and TNFalpha polymorphism association in microscopic colitis*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2008. **20**(4): p. 276-82.
119. Fernández-Bañares, F., et al., *Predisposing HLA-DQ2 and HLA-DQ8 haplotypes of coeliac disease and associated enteropathy in microscopic colitis*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2005. **17**(12): p. 1333-8.
120. Westerlind, H., et al., *Dense genotyping of immune-related loci identifies HLA variants associated with increased risk of collagenous colitis*. Gut, 2015.
121. Madisch, A., et al., *Allelic variation of the matrix metalloproteinase-9 gene is associated with collagenous colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(11): p. 2295-8.
122. Madisch, A., et al., *NOD2/CARD15 gene polymorphisms are not associated with collagenous colitis*. Int J Colorectal Dis, 2007. **22**(4): p. 425-8.
123. Bohr, J., et al., *Collagenous colitis: a retrospective study of clinical presentation and treatment in 163 patients*. Gut, 1996. **39**(6): p. 846-51.
124. Fischer, H., et al., *Altered microbiota in microscopic colitis*. Gut, 2015.
125. Rubio, C.A., *Lysozyme expression in microscopic colitis*. J Clin Pathol, 2011. **64**(6): p. 510-5.
126. Perner, A., et al., *Colonic production of nitric oxide gas in ulcerative colitis, collagenous colitis and uninfamed bowel*. Scand J Gastroenterol, 2002. **37**(2): p. 183-8.

127. Olesen, M., et al., *Luminal nitric oxide and epithelial expression of inducible and endothelial nitric oxide synthase in collagenous and lymphocytic colitis*. Scand J Gastroenterol, 2003. **38**(1): p. 66-72.
128. Lundberg, J.O., et al., *Increased nitric oxide production in collagenous and lymphocytic colitis*. Eur J Clin Invest, 1997. **27**(10): p. 869-71.
129. Andresen, L., et al., *Activation of nuclear factor kappaB in colonic mucosa from patients with collagenous and ulcerative colitis*. Gut, 2005. **54**(4): p. 503-9.
130. Perner, A., et al., *Expression of nitric oxide synthases and effects of L-arginine and L-NMMA on nitric oxide production and fluid transport in collagenous colitis*. Gut, 2001. **49**(3): p. 387-94.
131. Bonderup, O.K., et al., *Budesonide treatment and expression of inducible nitric oxide synthase mRNA in colonic mucosa in collagenous colitis*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2006. **18**(10): p. 1095-9.
132. Olesen, M., et al., *Lymphocytic colitis: a retrospective clinical study of 199 Swedish patients*. Gut, 2004. **53**(4): p. 536-41.
133. Munch, A., et al., *Increased transmucosal uptake of E. coli K12 in collagenous colitis persists after budesonide treatment*. Am J Gastroenterol, 2009. **104**(3): p. 679-85.
134. Munch, A., et al., *Low levels of bile acids increase bacterial uptake in colonic biopsies from patients with collagenous colitis in remission*. Aliment Pharmacol Ther, 2011. **33**(8): p. 954-60.
135. Levy, A.M., et al., *Increased eosinophil infiltration and degranulation in colonic tissue from patients with collagenous colitis*. Am J Gastroenterol, 2001. **96**(5): p. 1522-8.
136. Stahle-Backdahl, M., et al., *Increased presence of eosinophilic granulocytes expressing transforming growth factor-beta1 in collagenous colitis*. Scand J Gastroenterol, 2000. **35**(7): p. 742-6.
137. Wagner, M., et al., *Budesonide treatment of patients with collagenous colitis restores normal eosinophil and T-cell activity in the colon*. Inflamm Bowel Dis, 2010. **16**(7): p. 1118-26.
138. Arevalo, F., et al., *[Eosinophilic and lymphocytic colitis: different histological manifestations of a same process in patients with chronic diarrhea]*. Rev Gastroenterol Peru, 2013. **33**(1): p. 39-42.
139. Wagner, M., et al., *Elevated fecal levels of eosinophil granule proteins predict collagenous colitis in patients referred to colonoscopy due to chronic non-bloody diarrhea*. Scand J Gastroenterol, 2016: p. 1-7.
140. Wagner, M., et al., *Fecal eosinophil cationic protein as a marker of active disease and treatment outcome in collagenous colitis: a pilot study*. Scand J Gastroenterol, 2011. **46**(7-8): p. 849-54.
141. Goranzon, C., et al., *Immunohistochemical characterization of lymphocytes in microscopic colitis*. J Crohns Colitis, 2013. **7**(10): p. e434-42.
142. Kumawat, A.K., et al., *Microscopic colitis patients have increased proportions of Ki67(+) proliferating and CD45RO(+) active/memory CD8(+) and CD4(+)8(+) mucosal T cells*. J Crohns Colitis, 2013. **7**(9): p. 694-705.
143. Bai, S., G.P. Siegal, and N.C. Jhala, *Foxp3 expression patterns in microscopic colitides: a clinicopathologic study of 69 patients*. Am J Clin Pathol, 2012. **137**(6): p. 931-6.

144. Fernández-Bañares, F., et al., *Paucicellular lymphocytic colitis: is it a minor form of lymphocytic colitis? A clinical pathological and immunological study*. Am J Gastroenterol, 2009. **104**(5): p. 1189-98.
145. Kumawat, A.K., et al., *Reduced T cell receptor excision circle levels in the colonic mucosa of microscopic colitis patients indicate local proliferation rather than homing of peripheral lymphocytes to the inflamed mucosa*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 408638.
146. Fernandez-Banares, F., et al., *Current concepts on microscopic colitis: evidence-based statements and recommendations of the Spanish Microscopic Colitis Group*. Aliment Pharmacol Ther, 2016. **43**(3): p. 400-26.
147. Kumawat, A.K., et al., *An in vitro model to evaluate the impact of the soluble factors from the colonic mucosa of collagenous colitis patients on T cells: enhanced production of IL-17A and IL-10 from peripheral CD4(+) T cells*. Mediators Inflamm, 2014. **2014**: p. 879843.
148. Kumawat, A.K., et al., *Microscopic colitis patients demonstrate a mixed Th17/Tc17 and Th1/Tc1 mucosal cytokine profile*. Mol Immunol, 2013. **55**(3-4): p. 355-64.
149. Dey, I., P.L. Beck, and K. Chadee, *Lymphocytic colitis is associated with increased pro-inflammatory cytokine profile and up regulation of prostaglandin receptor EP4*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e61891.
150. Tagkalidis, P.P., P.R. Gibson, and P.S. Bhathal, *Microscopic colitis demonstrates a T helper cell type 1 mucosal cytokine profile*. J Clin Pathol, 2007. **60**(4): p. 382-7.
151. Gunaltay, S., et al., *Enhanced levels of chemokines and their receptors in the colon of microscopic colitis patients indicate mixed immune cell recruitment*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 132458.
152. Park, E.K., et al., *Cytokine expression of microscopic colitis including interleukin-17*. Gut Liver, 2015. **9**(3): p. 381-7.
153. Mosnier, J.F., et al., *Lymphocytic and collagenous colitis: an immunohistochemical study*. Am J Gastroenterol, 1996. **91**(4): p. 709-13.
154. Johrens, K., M. Grunbaum, and I. Anagnostopoulos, *Differences in the T-bet and GATA-3 expression patterns between lymphocytic colitis and coeliac disease*. Virchows Arch, 2010. **457**(4): p. 451-6.
155. Aigner, T., et al., *Extracellular matrix composition and gene expression in collagenous colitis*. Gastroenterology, 1997. **113**(1): p. 136-43.
156. Günther, U., et al., *Fibrogenesis and fibrolysis in collagenous colitis. Patterns of procollagen types I and IV, matrix-metalloproteinase-1 and -13, and TIMP-1 gene expression*. Am J Pathol, 1999. **155**(2): p. 493-503.
157. Hwang, W.S., et al., *Collagenous colitis: a disease of pericryptal fibroblast sheath?* J Pathol, 1986. **149**(1): p. 33-40.
158. Widgren, S., R. Jlidi, and J.N. Cox, *Collagenous colitis: histologic, morphometric, immunohistochemical and ultrastructural studies. Report of 21 cases*. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 1988. **413**(4): p. 287-96.
159. Griga, T., et al., *Collagenous colitis: implications for the role of vascular endothelial growth factor in repair mechanisms*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2004. **16**(4): p. 397-402.

160. Taha, Y., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF)--a possible mediator of inflammation and mucosal permeability in patients with collagenous colitis*. *Dig Dis Sci*, 2004. **49**(1): p. 109-15.
161. Gunther, U., et al., *Connective tissue growth factor expression is increased in collagenous colitis and coeliac disease*. *Histopathology*, 2010. **57**(3): p. 427-35.
162. Wagner, M., et al., *Increased fecal levels of chromogranin A, chromogranin B, and secretoneurin in collagenous colitis*. *Inflammation*, 2013. **36**(4): p. 855-61.
163. Fernandez-Banares, F. and J.P. Gisbert, *Letter: are lymphocytic colitis and collagenous colitis really the same disease?* *Aliment Pharmacol Ther*, 2012. **36**(6): p. 606.
164. Mellander, M.R., et al., *Microscopic colitis: a descriptive clinical cohort study of 795 patients with collagenous and lymphocytic colitis*. *Scand J Gastroenterol*, 2016. **51**(5): p. 556-62.
165. Baert, F., et al., *Lymphocytic colitis: a distinct clinical entity? A clinicopathological confrontation of lymphocytic and collagenous colitis*. *Gut*, 1999. **45**(3): p. 375-81.
166. Mullhaupt, B., et al., *Lymphocytic colitis: clinical presentation and long term course*. *Gut*, 1998. **43**(5): p. 629-33.
167. Miehlke, S., et al., *Budesonide is effective in treating lymphocytic colitis: a randomized double-blind placebo-controlled study*. *Gastroenterology*, 2009. **136**(7): p. 2092-100.
168. Chande, N., J.W. McDonald, and J.K. Macdonald, *Interventions for treating collagenous colitis*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2008(2): p. Cd003575.
169. Rasmussen, J., et al., *The Temporal Evolution of Histological Abnormalities in Microscopic Colitis*. *J Crohns Colitis*, 2016. **10**(3): p. 262-8.
170. Vigren, L., et al., *Are collagenous and lymphocytic colitis different aspects of the same disease?* *Scand J Gastroenterol*, 2012. **47**(12): p. 1448-53.
171. Giardiello, F.M., F.W. Jackson, and A.J. Lazenby, *Metachronous occurrence of collagenous colitis and ulcerative colitis*. *Gut*, 1991. **32**(4): p. 447-9.
172. Pokorny, C.S., K.L. Kneale, and C.J. Henderson, *Progression of collagenous colitis to ulcerative colitis*. *J Clin Gastroenterol*, 2001. **32**(5): p. 435-8.
173. Freeman, H.J., K.W. Berean, and M. Nimmo, *Evolution of collagenous colitis into severe and extensive ulcerative colitis*. *Can J Gastroenterol*, 2007. **21**(5): p. 315-8.
174. Aqel, B., et al., *Collagenous colitis evolving into ulcerative colitis: a case report and review of the literature*. *Dig Dis Sci*, 2003. **48**(12): p. 2323-7.
175. Chandratre, S., et al., *Simultaneous occurrence of collagenous colitis and Crohn's disease*. *Digestion*, 1987. **36**(1): p. 55-60.
176. Jegadeesan, R., et al., *Microscopic colitis: is it a spectrum of inflammatory bowel disease?* *World J Gastroenterol*, 2013. **19**(26): p. 4252-6.
177. Goldstein, N.S. and T. Gyorf, *Focal lymphocytic colitis and collagenous colitis: patterns of Crohn's colitis?* *Am J Surg Pathol*, 1999. **23**(9): p. 1075-81.
178. Wang, N., et al., *Colonic epithelial lymphocytosis without a thickened subepithelial collagen table: a clinicopathologic study of 40 cases supporting a heterogeneous entity*. *Am J Surg Pathol*, 1999. **23**(9): p. 1068-74.

179. Junker, Y., et al., *Comparative analysis of mononuclear cells isolated from mucosal lymphoid follicles of the human ileum and colon*. Clin Exp Immunol, 2009. **156**(2): p. 232-7.
180. Omenetti, S. and T.T. Pizarro, *The Treg/Th17 Axis: A Dynamic Balance Regulated by the Gut Microbiome*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 639.
181. Furusawa, Y., Y. Obata, and K. Hase, *Commensal microbiota regulates T cell fate decision in the gut*. Semin Immunopathol, 2015. **37**(1): p. 17-25.
182. Cheuning, J.H. and C.T. Weaver, *Development and survival of Th17 cells within the intestines: the influence of microbiome- and diet-derived signals*. J Immunol, 2014. **193**(10): p. 4769-77.
183. Brucklacher-Waldert, V., et al., *Cellular Plasticity of CD4+ T Cells in the Intestine*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 488.
184. Verdier, J., et al., *Compartmentalized expression of Th1 and Th17 cytokines in pediatric inflammatory bowel diseases*. Inflamm Bowel Dis, 2012. **18**(7): p. 1260-6.
185. Evguenieva-Hackenberg, E. and G. Klug, *New aspects of RNA processing in prokaryotes*. Curr Opin Microbiol, 2011. **14**(5): p. 587-92.
186. Zanzi, D., et al., *IL-15 interferes with suppressive activity of intestinal regulatory T cells expanded in Celiac disease*. Am J Gastroenterol, 2011. **106**(7): p. 1308-17.
187. Makita, S., et al., *CD4+CD25bright T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells*. J Immunol, 2004. **173**(5): p. 3119-30.
188. Ueno, A., et al., *Increased prevalence of circulating novel IL-17 secreting Foxp3 expressing CD4+ T cells and defective suppressive function of circulating Foxp3+ regulatory cells support plasticity between Th17 and regulatory T cells in inflammatory bowel disease patients*. Inflamm Bowel Dis, 2013. **19**(12): p. 2522-34.
189. Bernardo, D., et al., *T-cell proliferation and forkhead box P3 expression in human T cells are dependent on T-cell density: physics of a confined space?* Hum Immunol, 2012. **73**(3): p. 223-31.
190. Lord, J.D., *Promises and paradoxes of regulatory T cells in inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2015. **21**(40): p. 11236-45.
191. Sundin, J., et al., *Aberrant mucosal lymphocyte number and subsets in the colon of post-infectious irritable bowel syndrome patients*. Scand J Gastroenterol, 2014. **49**(9): p. 1068-75.
192. Suni, M.A., et al., *CD4(+)CD8(dim) T lymphocytes exhibit enhanced cytokine expression, proliferation and cytotoxic activity in response to HCMV and HIV-1 antigens*. Eur J Immunol, 2001. **31**(8): p. 2512-20.
193. Mayans, S., et al., *alphabetaT cell receptors expressed by CD4(-)CD8alphabeta(-) intraepithelial T cells drive their fate into a unique lineage with unusual MHC reactivities*. Immunity, 2014. **41**(2): p. 207-18.
194. Grishkan, I.V., et al., *Helper T cells down-regulate CD4 expression upon chronic stimulation giving rise to double-negative T cells*. Cell Immunol, 2013. **284**(1-2): p. 68-74.
195. Sturm, A. and C. Fiocchi, *Life and death in the gut: more killing, less Crohn's*. Gut, 2002. **50**(2): p. 148-9.

196. Serriari, N.E., et al., *Innate mucosal-associated invariant T (MAIT) cells are activated in inflammatory bowel diseases*. Clin Exp Immunol, 2014. **176**(2): p. 266-74.
197. O'Toole, A., *Optimal management of collagenous colitis: a review*. Clin Exp Gastroenterol, 2016. **9**: p. 31-9.
198. Paul, G., V. Khare, and C. Gasche, *Inflamed gut mucosa: downstream of interleukin-10*. Eur J Clin Invest, 2012. **42**(1): p. 95-109.
199. Bhagat, G., et al., *Small intestinal CD8+TCRgammadelta+NKG2A+ intraepithelial lymphocytes have attributes of regulatory cells in patients with celiac disease*. J Clin Invest, 2008. **118**(1): p. 281-93.
200. Abadie, V. and B. Jabri, *IL-15: a central regulator of celiac disease immunopathology*. Immunol Rev, 2014. **260**(1): p. 221-34.
201. Maiuri, L., et al., *IL-15 drives the specific migration of CD94+ and TCR-gammadelta+ intraepithelial lymphocytes in organ cultures of treated celiac patients*. Am J Gastroenterol, 2001. **96**(1): p. 150-6.
202. !!! INVALID CITATION !!! {}.
203. Vigren, L., et al., *Celiac disease and other autoimmune diseases in patients with collagenous colitis*. Scand J Gastroenterol, 2013. **48**(8): p. 944-50.
204. Carrasco, A., et al., *Immunological Differences between Lymphocytic and Collagenous Colitis*. J Crohns Colitis, 2016.
205. Sankaran-Walters, S., et al., *Sex differences matter in the gut: effect on mucosal immune activation and inflammation*. Biol Sex Differ, 2013. **4**(1): p. 10.
206. Sansoni, P., et al., *The immune system in extreme longevity*. Exp Gerontol, 2008. **43**(2): p. 61-5.
207. Camarero, C., et al., *Age-related variation of intraepithelial lymphocytes subsets in normal human duodenal mucosa*. Dig Dis Sci, 2007. **52**(3): p. 685-91.

ANNEXES

There's a way to do it better. Find it.

Thomas A. Edison

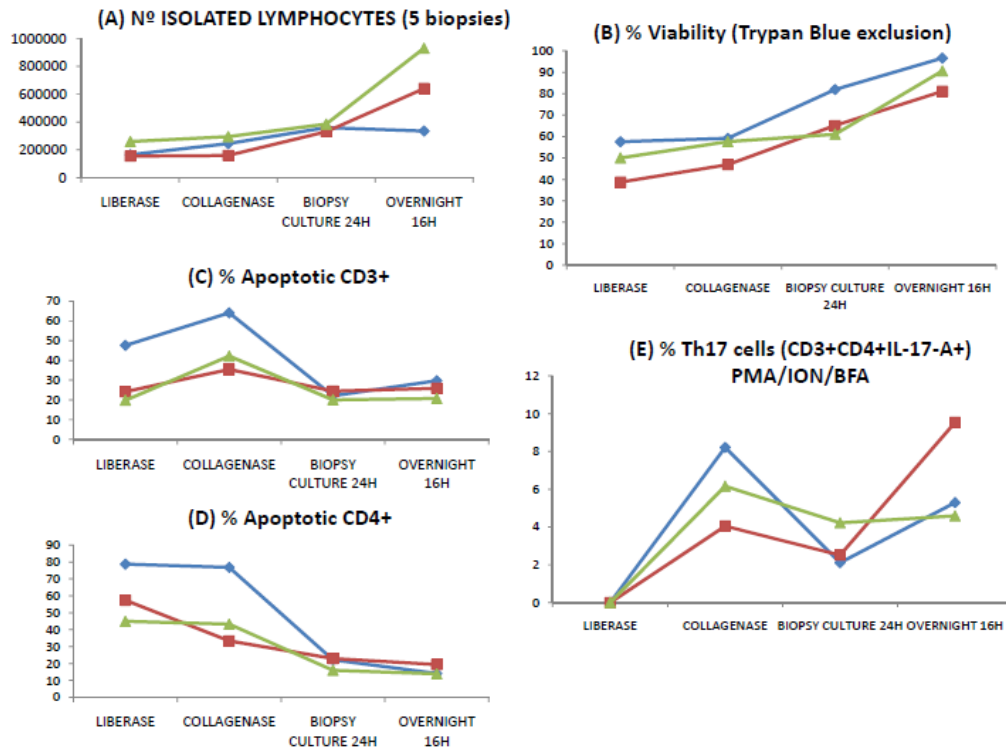
ANNEX 1. Aspectes metodològics

La metodologia és un aspecte essencial en els estudis de recerca, que pot condicionar els resultats obtinguts i freqüentment no rep l'atenció que mereix. La metodologia d'aïllament cel·lular emprada en els articles d'aquesta tesi doctoral ha estat validada al nostre laboratori i comparada amb d'altres tècniques. Fruit d'aquesta comparació de tècniques, que va ser el Treball de Final de Màster de la doctorand, es va publicar un article a la revista *Journal of Immunological Methods* l'any 2013, que s'adjunta a continuació [17].

A continuació s'ha afegit una revisió sobre la metodologia d'aïllament de limfòcits a partir de biòpsies realitzada per a una ponència del 1r Curs en Investigació Bàsica i Translacional en Digestologia i publicada als Suplements dels Anals de Medicina (vol.99, supl.1, S1-S14). Aquest curs, organitzat pels Drs. Josep Manyé i Jordi Gracia es va celebrar el passat mes de gener de 2016 en el XXV Congrés de la Societat Catalana de Digestologia.

A petició d'un dels revisors del primer estudi d'aquesta tesi doctoral, es van realitzar uns experiments addicionals de validació que corroboren i amplien els resultats de l'estudi metodològic previ [17], que es mostren en una figura a continuació. En aquesta validació addicional, a més de les tres tècniques prèviament comparades (cultiu de biòpsia, *overnight* enzimàtic "suau" i aïllament enzimàtic amb col·lagenasa 1mg/mL 30 min) s'ha afegit un altre mètode enzimàtic (Liberasa, Roche, 0.2 Wüch Unit/mL, 30 min). Es confirma de nou que el mètode *overnight* suau és el que ofereix un major rendiment cel·lular (A) i la major viabilitat mesurada per l'exclusió de blau tripà (B), corroborant els resultats previs [17]. A més també es demostra que amb aquesta metodologia *overnight*, juntament amb el cultiu de biòpsia, s'obté un menor percentatge d'apoptosi de limfòcits T (C) i Th (D), confirmant que són dos mètodes molt poc agressius per a les cèl·lules i que no indueixen la seva mort. A més, també s'ha comparat l'efecte del cultiu amb PMA/Ionomicina/BrefeldinaA sobre la inducció de la producció d'IL-17-A mesurada per citometria de fluxe intracel·lular, sense detectar diferències entre el mètode *overnight*

i el mètode convencional (col·lagenasa) i detectant en canvi valors notablement més baixos en els mètodes de cultiu i d'aïllament per Liberasa (E). Ni el percentatge d'apoptosi ni els nivells de citocines intracel·lulars després de cultiu es van valorar en el treball original. Aquests resultats corroboren que la elecció de la metodologia emprada en aquesta tesi ha estat encertada i amplien la informació sobre l'efecte dels diferents mètodes d'aïllament sobre els limfòcits.





Research paper

Comparison of lymphocyte isolation methods for endoscopic biopsy specimens from the colonic mucosa [☆]

Anna Carrasco ^{a,e}, Josep Mañé ^{b,e}, Rebeca Santaolalla ^{a,e}, Elisabet Pedrosa ^{b,e}, Josefina Mallolas ^a, Violeta Lorén ^{b,e}, Marco Fernández ^c, Fernando Fernández-Bañares ^{a,e}, Mercè Rosinach ^{a,e}, Carme Loras ^{a,e}, Montserrat Forné ^{a,e}, Xavier Andújar ^a, Judith Vidal ^d, Josep Maria Viver ^{a,e}, Maria Esteve ^{a,e,*}

^a Department of Gastroenterology, Hospital Universitari Mútua de Terrassa, University of Barcelona, Research Foundation Mútua de Terrassa, Terrassa, Barcelona, Catalonia, Spain

^b Gastroenterology & Nutrition Research Unit, Health Sciences Research Institute, Germans Trias i Pujol Foundation, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Autonomous University of Barcelona, Badalona, Barcelona, Catalonia, Spain

^c Flow cytometry Unit, Health Sciences Research Institute Germans Trias i Pujol Foundation, Badalona, Barcelona, Catalonia, Spain

^d Flow Cytometry Unit, CATLAB, Viladecavalls, Barcelona, Catalonia, Spain

^e CIBERehd, Centro de Investigación Biomédica en Red en el Área temática de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 August 2012

Received in revised form 26 November 2012

Accepted 18 December 2012

Available online 30 December 2012

Keywords:

Lamina propria lymphocytes

Intraepithelial lymphocytes

Colonic biopsies

Isolation methods

Epithelium removal

ABSTRACT

An ideal method of immune cell isolation should provide maximum cell yield without disturbing functional properties. Intestinal endoscopic biopsies, in contrast to surgical samples, allow the study of all disease stages but have the drawback of a minimum amount of tissue available, making protocol optimization mandatory. We compared for the first time two methods of separation of colonic epithelium and five methods of lamina propria cell isolation for colonic biopsy specimens (mechanical, enzymatic and organ culture protocols). Lymphocyte number, viability and phenotype (CD45+, CD103+, CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD16-56+) were analyzed by flow cytometry. Neither of the two epithelial detachment protocols achieved proper epithelial separation, though the high intensity ion chelation method was more accurate. Maximum cell yield of lamina propria lymphocytes without phenotypic modification was obtained with overnight smooth enzymatic digestion. High dose collagenase incubation caused a marked decrease in CD4+ lymphocytes of the lamina propria as compared to low enzymatic method ($p = 0.004$). Mechanical and biopsy culture are not advisable methods because of the low cell yield, and phenotypic alterations and high contamination rate, respectively.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: CM, complete media; DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; HBSS, Hank's Buffered Salt Solution; IEL, intraepithelial lymphocytes; LPL, lamina propria lymphocytes; CI, confidence interval; IHC, immunohistochemistry; IQI, interquartile interval.

[☆] Supported by: GETECCU-FAES, and the Spanish Ministry of Science and Innovation BFU 2007-64887 and BFU 2010-19888. Reprints: Maria Esteve, MD, PhD.

* Corresponding author at: Department of Gastroenterology, Hospital Universitari Mútua de Terrassa, University of Barcelona; Pl. Dr. Robert 5, 08221 Terrassa, Barcelona, Catalonia, Spain. Tel.: +34 93 736 50 50x1215, fax: +34 93 736 50 43.

E-mail address: mestevecomas@telefonica.net (M. Esteve).

1. Introduction

The obtaining of single cell suspensions of intraepithelial and lamina propria mucosal lymphocytes from endoscopic biopsy specimens is crucial for research study of the physiopathology of chronic inflammatory conditions. The majority of studies assessing immune cell function have used surgical specimens instead of endoscopic biopsies since the increased quantity of tissue allows higher cell recovery (Selby et al., 1984). However, the majority of patients operated on due to medical treatment failure are those with a more aggressive and

refractory process and they are not representative of the full spectrum of intestinal diseases. By contrast, endoscopic biopsies allow sample acquisition in all disease stages. In fact, there is information in the medical literature indicating that in some chronic inflammatory processes, such as Crohn's disease, the immunological response differs in the initial phases compared with more advanced stages (Veny et al., 2010).

Thus, availability of isolation methods providing the highest possible cellular yield while maintaining phenotypic and functional characteristics of the different cell types is indispensable. However, as far as we know the several previously described methods have not been compared using endoscopic biopsies of the intestinal mucosa. Moreover, enzymes and other buffers and reagents used in isolation have the potential to alter cell phenotype and functionality (Van Damme et al., 2000).

Another interesting issue in immunological mucosal studies is the achievement of proper separation of immunological compartments. As each compartment contains different cell types with different properties and functions, correct separation is essential for a better understanding of mucosal immune complexity.

The aims of the study were to: 1. assess the efficiency of two methods of separation of epithelium and lamina propria compartments, and 2. evaluate and compare five different methods of lymphocyte isolation of lamina propria, as well as to elucidate the effect of those methods on cell number, viability and cell phenotype.

2. Methods

2.1. Samples and study design

Eighteen endoscopic biopsy specimens were obtained from the colonic mucosa of 27 healthy controls. None of them had any inflammatory condition of the colon, and the colonoscopy was performed due to anal bleeding (hemorrhoids or fissure) or due to colorectal cancer prevention. Informed consent was obtained from all subjects. The study protocol was approved by the ethics committee of the hospital.

Biopsies were collected in complete media (CM) – Advanced RPMI-1640 supplemented with 2 mM L-glutamine, Amphotericin B, Streptomycin, Penicillin, and 2% Fetal Bovine Serum (all from Gibco, Life Technologies, Paisley, UK) – and processed within 1 h of collection. Additional biopsy specimens were collected and then preserved in 4% formol and embedded in paraffin to confirm the existence of histologically normal mucosa and to perform immunohistochemistry studies (see below, Methods Section 2.5).

2.2. Methods of epithelial layer removal

Two previously described protocols (McAlindon et al., 1998; Santaolalla et al., 2011) for removing the epithelial layer from the lamina propria, based on different intensities of ion chelation method using 1,4-dithiothreitol (DTT) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), were compared.

All solutions for epithelial detachment were freshly prepared with calcium- and magnesium-free Hank's Buffered

Salt Solution (HBSS) (Gibco, Life Technologies, Paisley, UK), and pH was adjusted to 7.2–7.4 before use.

2.2.1. Method of intense epithelial layer removal (Mahida et al., 1997)

Biopsies were incubated separately in DTT and EDTA. First, biopsies were incubated for 15 min at room temperature in an orbital shaker in 1 mM DTT solution. Second, biopsies were incubated three times in a shaking bath for 30 min at 37 °C in 20 mL of 1 mM EDTA solution. Between each incubation with EDTA, biopsies were rinsed in fresh HBSS.

2.2.2. Method of smooth epithelial layer removal (Santaolalla et al., 2011)

Biopsies were placed in 1 mM DTT and 1 mM EDTA saline solution and incubated in orbital shaker only once for 25 min at room temperature.

The epithelial fractions obtained with both smooth and intense methods, containing intraepithelial lymphocytes (IEL), were collected, filtered (40 µm nylon cell strainer-Becton Dickinson, NJ, USA), centrifuged (10 min, 1500 rpm), and resuspended in complete media.

After epithelial detachment, two remnant biopsies from both methods were formalin-fixed to monitor the effect of each protocol on the tissue, whereas the other remnant biopsies were further processed (see below, Methods Section 2.3) in order to obtain the lamina propria fraction, containing lamina propria lymphocytes (LPL) (Fig. 1).

The efficacy of epithelial fraction separation was measured by immunohistochemistry of the remaining tissue and by flow cytometry. The obtained cell suspensions, of both intraepithelial and lamina propria fractions, were assessed by flow cytometry. Two cytometric criteria are considered to define intraepithelial fraction purity: 1) a high percentage of CD3 + CD8 + CD103 + cells, and 2) a ratio CD4 + /CD8 + ≤ 0.5 for both duodenal and colonic mucosa (Van Damme et al., 2001). Though the percentage of CD103 + lymphocytes required for high purity of the epithelial colonic compartment is not well established, it is known that it should be higher than 90% in epithelial duodenal mucosa (Eiras et al., 1998).

2.3. Methods of lamina propria lymphocyte isolation

Five methods of lamina propria lymphocyte isolation were compared (Fig. 2).

Three of them were preceded by smooth and one by intense epithelial removal protocol. For the remaining protocol (mechanical method), endoscopic biopsies were processed without previous epithelial removal. All the protocols used are detailed below.

2.3.1. Enzymatic methods

As previously mentioned, after the smooth epithelial removal, three protocols were compared: a) non-enzyme Overnight (ON) incubation in complete media without enzymes, b) low-dose enzyme ON incubation with a low concentration enzyme mixture (collagenase, deoxyribonuclease and hyaluronidase, at 0.5 µg/mL each one, from Sigma Aldrich, St. Louis, MO) (Bull and Bookman, 1977; Santaolalla et al., 2011), and c) high-dose enzyme incubation with 1 mg/mL collagenase

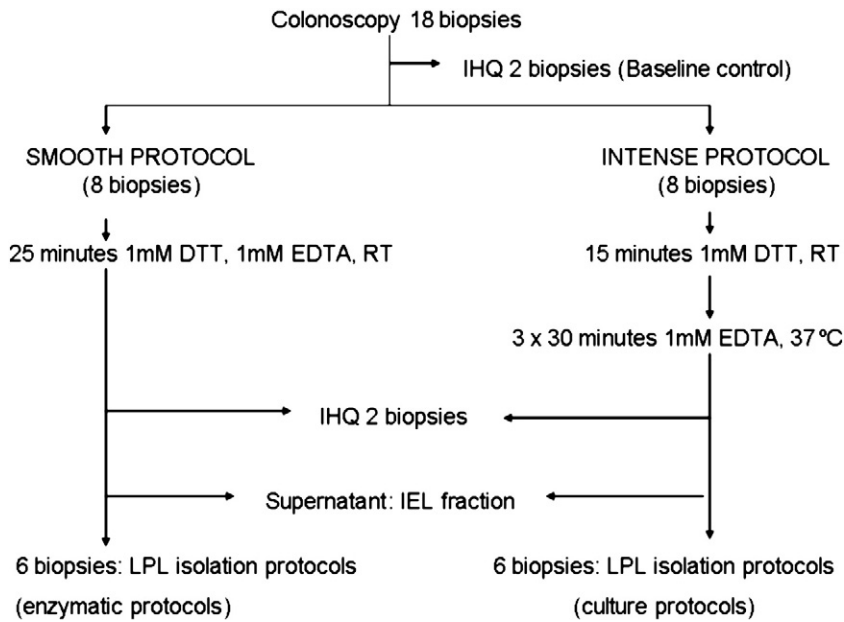


Fig. 1. Intraepithelial lymphocyte isolation methods. IHC: immunohistochemistry; IEL: intraepithelial lymphocytes; LPL: lamina propria lymphocytes; RT: room temperature.

suspension for 1 h. The non-enzyme protocol was introduced as control, in order to elucidate the effects of enzymes on cell phenotype (Fig. 3).

2.3.2. Tissue culture methods

After intense epithelial removal protocol, biopsies were placed on Petri dishes containing 3 to 5 mL of CM and incubated for 24 h at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. As previously described (Mahida et al., 1997), spontaneous cellular release from the

tissue occurred. At 24 h, biopsies were transferred to fresh CM for 24 h additional incubation, and the dishes were washed several times with vigorous pipetting to recover the released cells.

2.3.3. Mechanical methods

Entire biopsies were dissociated with GentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotech, Cologne, Germany) following the

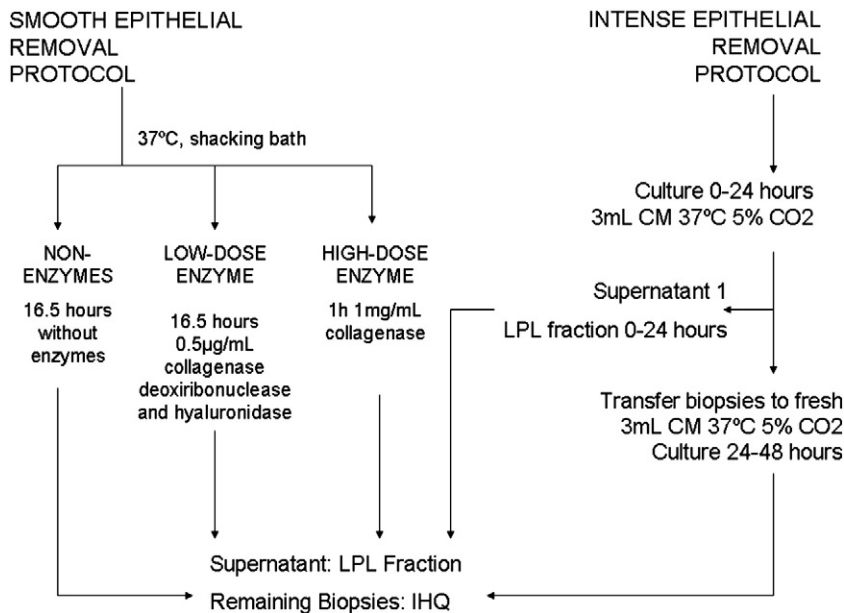


Fig. 2. Lamina propria lymphocyte isolation methods. IHC: immunohistochemistry; LPL: lamina propria lymphocytes; CM: complete media (supplemented Advanced-RPMI-1640).

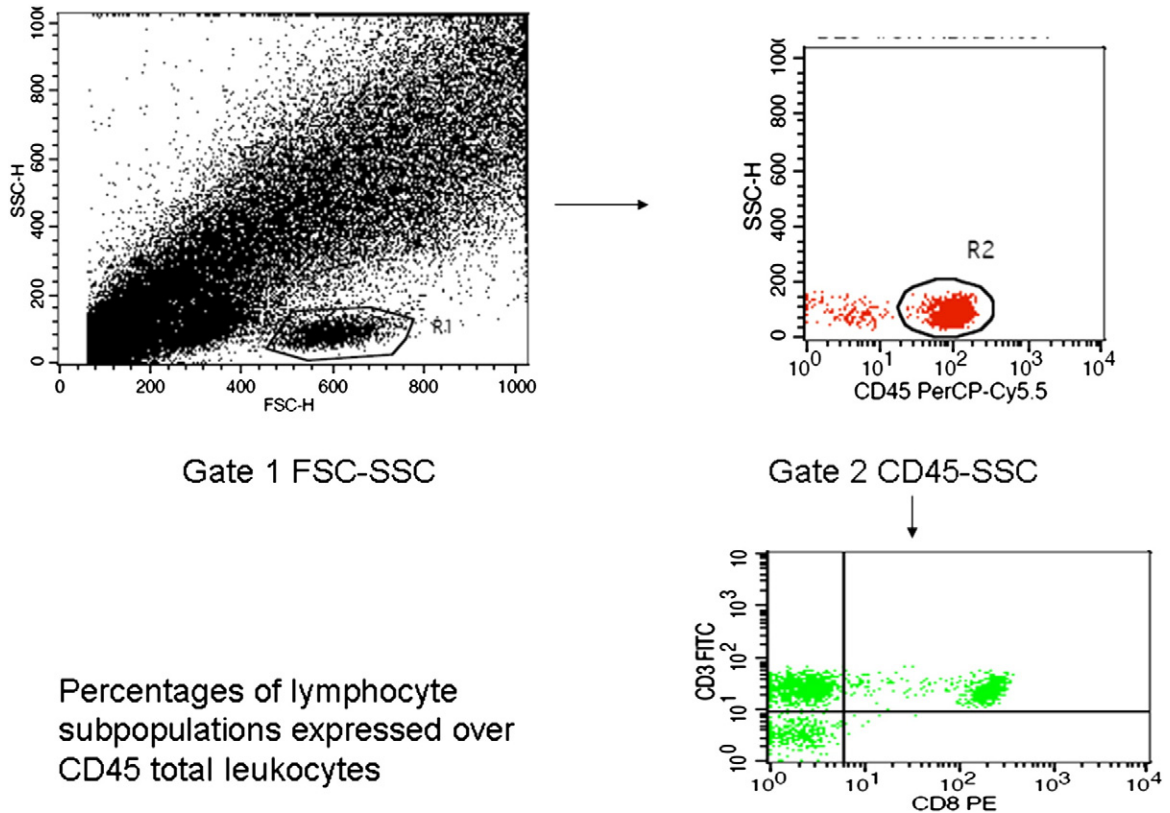


Fig. 3. Flow cytometry analysis.

manufacturer's instructions as described for other tissues (Jungblut et al., 2008).

2.4. Purification of the cell suspension

All the suspensions were filtered through a 40 μm nylon mesh (Cell-strainer, Becton Dickinson, NJ, USA) in order to remove debris. At first the obtained cell suspensions were further purified by discontinuous Percoll gradient. However, as this technique caused significant cell loss and did not improve flow cytometry acquisition (data not shown), it was not used with the majority of subsequent samples. Cell counts and viability were assessed with trypan blue exclusion in haemocytometer (Neubauer Chamber) in a light microscope. For comparison between isolation methods, cell yield was expressed as the number of viable cells obtained per biopsy (number of viable cells obtained in haemocytometer/number of biopsies used). Cell suspensions were discarded if viability was less than 90%.

2.5. Immunohistochemistry

Before or after the epithelial removal protocols, as previously mentioned (Section 2.1), biopsies were immersed in formol for 24 h, dehydrated, and included in paraffin blocks. Four μm slides were obtained and stained with haematoxylin-eosin or anti-CD3 rabbit polyclonal antibody (Dako, Denmark) using an automated staining system (Envision Flex and Autostainer, Dako,

Denmark) to demonstrate efficiency in the removal of the epithelium.

2.6. Flow cytometry

Cell surface staining was performed using previously titrated amounts of the following antibodies: CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD103, and CD16-56 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

After being stained, cell suspensions were fixed with Lysing Solution (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), washed once, and re-suspended in PBS. Cell suspensions were analyzed immediately after staining.

Cells were acquired in a FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and analyzed with the Cell-Quest PRO software. First gate was drawn in the forward-side scatter plot, and second gate was drawn over CD45+/SSC. Results of lymphocyte subsets are expressed as percentages of the second gate (Fig. 3).

2.7. Statistical analysis

Results are expressed as median (95% confidence interval-CI). Wilcoxon test was used to compare paired data between groups. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. All statistical tests were performed using SPSS 13.0 for Windows (Chicago, IL).

3. Results

3.1. Efficacy of the epithelial compartment separation protocols

In Table 1 the cell yield and flow cytometry results obtained with the two protocols (intense and smooth) are provided. The intense protocol achieved a significantly higher cell yield of the IEL fraction than did the smooth one ($p=0.028$). In addition, the ratio $CD4/CD8 \leq 0.5$, showing good IEL fraction purity, was only achieved with the intense protocol. Furthermore, the higher $CD103+$ percentage representative of the IEL phenotype was also higher with the intense (33.5%) compared to the smooth (16%) protocol ($p=0.043$). Some additional cytometric criteria confirmed that the highest intraepithelial compartment purity was obtained with the intense protocol (significantly lower percentages of $CD4+$ and $CD19+$ lymphocytes and a trend toward a higher percentage of $CD8+$ lymphocytes with the intense protocol compared to the smooth one). The persistence of $CD103$ in the lamina propria demonstrated by flow cytometry and persistence of epithelial remnant in immunohistochemical images following both methods of epithelial separation showed that neither of them achieved total epithelial removal (Fig. 4).

The LPLs achieved lamina propria criteria ($CD4/CD8$ ratio ≥ 1.5) using both methods. In addition, no differences were found for any of the lymphocyte subpopulations assessed. For this reason, the lamina propria fractions obtained with these two methods were further used to assess the performance of the different isolation methods of LPL (see Section 3.2 below).

3.2. Purity and phenotype of lamina propria lymphocytes obtained with different isolation methods

3.2.1. Enzymatic methods

The efficacy of the low-dose enzymatic method was first compared with the control medium without enzymes (Fig. 5). A non-significant trend toward a higher lymphocyte count was found with the former compared to that obtained in the control medium. No significant differences were obtained in the lymphocytic phenotype for any of the surface markers used. Thus, the low-dose enzymatic method

previously used by our research group (Mañé et al., 2009; Santaolalla et al., 2011) was considered thereafter the reference method for comparison with the remaining techniques. The high-dose enzymatic method did not increase the cell yield, and it caused a dramatic decrease in $CD4+$ T cells compared with the low-dose enzymatic method ($p=0.004$) (Fig. 6).

3.2.2. Culture methods

The culture methods achieved a similar cell yield to that obtained with the low-dose enzymatic method but with a higher percentage of $CD45+$ ($p=0.008$), $CD3+$ ($p=0.008$), and $CD4+$ ($p=0.008$). By contrast, a significant reduction in $CD19+$ percentage was observed ($p=0.0043$) (Fig. 7). This method had the drawback of an elevated contamination rate (33% at 24 h and 66% at 48 h), probably due to the high content of intestinal flora in colonic samples. This high contamination rate could not be overcome by duplicating antibiotic concentration in the culture media.

3.2.3. Mechanical methods

The mechanical methods obtained the lowest cell yield of all the isolation techniques, and compared with the low-dose enzymatic method a significantly reduced cell count was obtained ($p=0.043$). Concerning the lymphocyte phenotype assessed by flow cytometry, a trend toward a lower $CD19+$ value was observed with mechanical methods compared to the low-dose enzymatic method. In addition, a trend toward an inversion of $CD4+/CD8+$ values was observed, leading to a significant inversion of the $CD4+/CD8+$ ratio ($p=0.043$) (Fig. 8).

4. Discussion

The ideal method of mucosal lymphocyte isolation would provide the highest cell count with the minimum functional and phenotypic disturbances so as to reflect what occurs in vivo. In this sense, the first step is to obtain proper separation of the two functionally distinct intestinal compartments (epithelium and lamina propria). These separation techniques are well standardized in animal models (Weigmann et al., 2007), whereas controversy exists as to whether adequate

Table 1

Cell yield expressed as number of lymphocytes obtained per biopsy. Median (IQR 25–75). Wilcoxon Test.

	Cell yield	CD45 over FSC/SSC gate	CD8 + over total CD3	CD4 over total CD3	CD4/CD8 ratio	CD3 + CD103 + over CD3	CD8 + CD103 + over CD8 +	IEL phenotype (CD3 + CD8 + CD103 +) over CD45 +	CD19 + over total CD45
<i>Intraepithelial lymphocytes</i>									
Smooth	22888 (20750–50687)	93.44% (76.56–97.56)	38.2% (30.1–49.6)	28.28% (20.20–35.82)	1.46 (0.73–2.13)	47.0% (38.22–62.86)	68.75 (51.7–84.05)	16.0% (8.5–20.5)	42.51% (31.5–52.4)
Intense	59437 (34500–81500)	93.33% (90.26–94.03)	56.2% (45.8–72.1)	9.26% (7.77–11.28)	0.41 (0.28–0.48)	83.8% (72.6–90.1)	87.4% (81.6–95.1)	33.5% (27.5–44.5)	16.4% (11.7–20.3)
p	0.028	0.5	0.068	0.043	0.043	0.068	0.068	0.042	0.028
<i>Lamina propria lymphocytes</i>									
Smooth	67500 (62500–90000)	85.36 (74.01–90.11)	32.3% (13.96–39.89)	60.18% (56.06–64.30)	1.7 (1.04–2.78)	40.6% (19.0–43.8)	69.5% (39.7–77.9)	16.5% (10.0–31.0)	12.3% (5.6–21.9)
Intense	73750 (55555–138750)	96.44% (95.61–97.6)	25.6% (12.82–38.56)	59.88% (53.53–68.41)	1.89 (1.37–3.07)	24.9% (13.0–30.6)	55.1% (29.3–64.7)	22.0% (15.7–31.2)	6.6% (4.5–9.3)
p	0.286	0.028	0.465	0.5	0.314	0.068	0.068	0.039	0.075

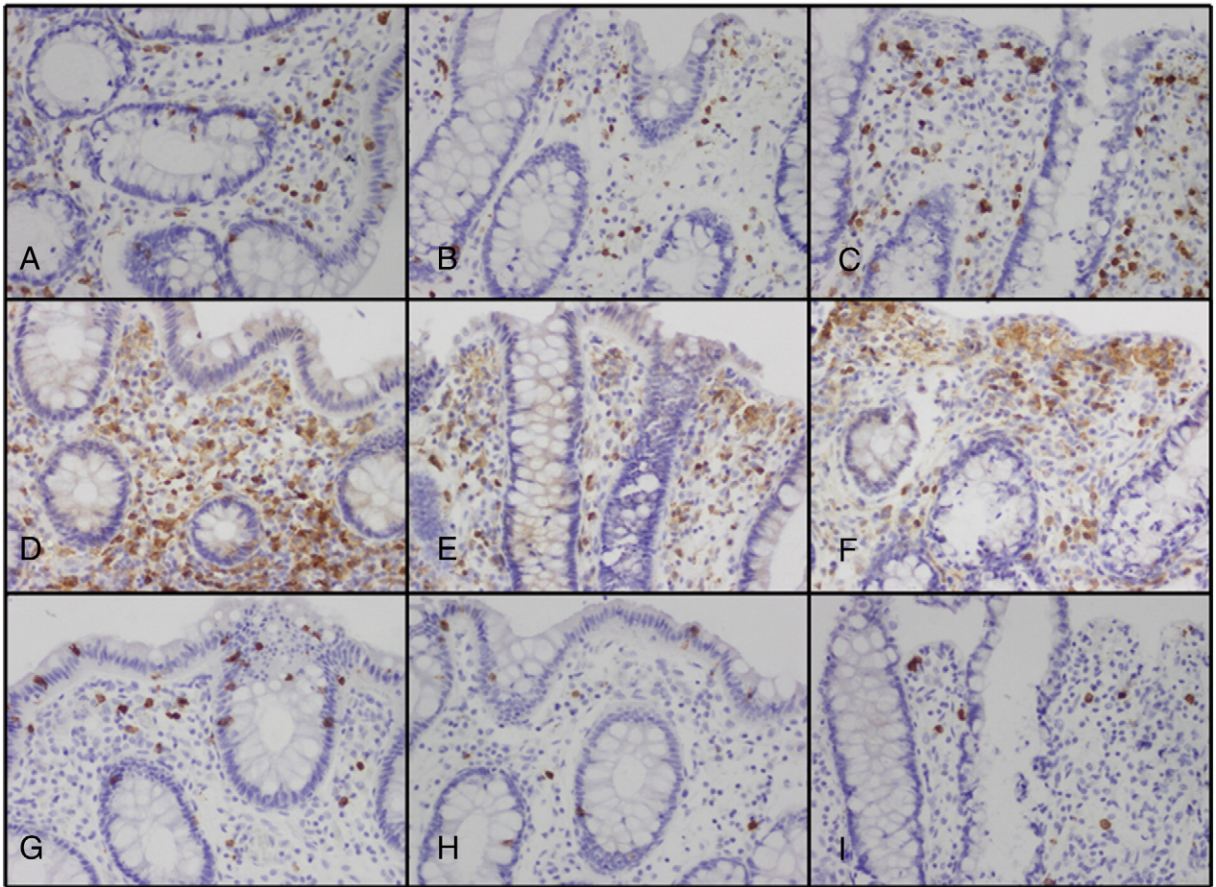


Fig. 4. Immunohistochemistry of a representative sample. A, D, and G: Before epithelium separation; B, E, and H: Method of smooth epithelial layer removal; C, F, and I: Method of intense epithelial layer removal. A, B, and C: CD3 immunostaining; D, E, and F: CD4 immunostaining; G,H,I: CD8 immunostaining. Magnification 400 \times .

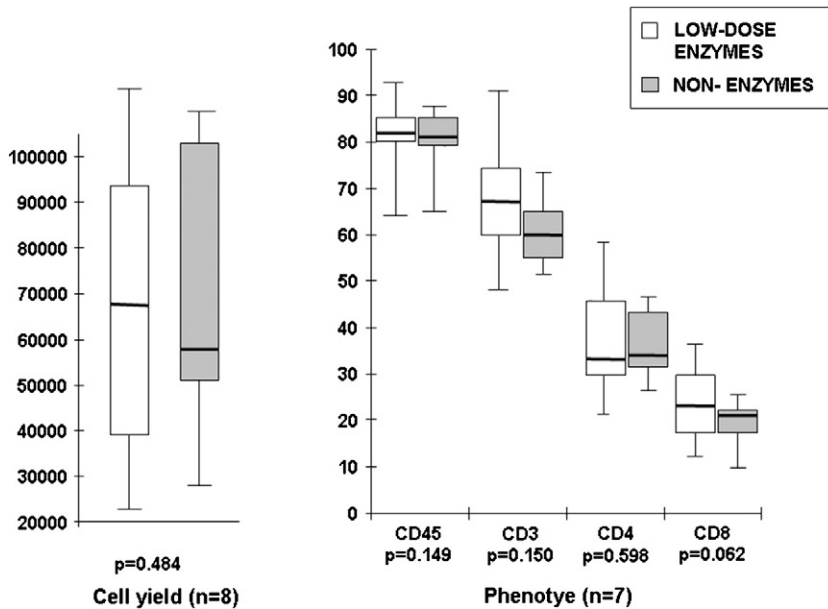


Fig. 5. Results. Left panel: number of lymphocytes isolated per biopsy. Right panel: Flow cytometry phenotypes. Results are expressed as median, interquartile interval (IQI), and limits. LP subsets are relative to CD45 + gated cells.

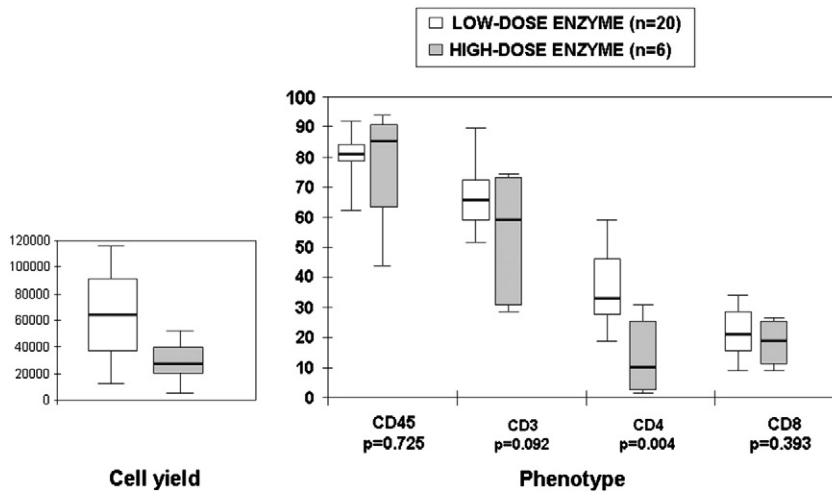


Fig. 6. Results. Left panel: number of lymphocytes isolated per biopsy. Right panel: Flow cytometry phenotypes. Results expressed as median, Interquartile interval (IQI), and limits. LP subsets are relative to CD45 + gated cells.

separation is obtained using human samples (Bull and Bookman, 1977; Mahida et al., 1997). In this sense, this is the first study comparing two previously described protocols using the small amount of tissue obtained in endoscopic colonic biopsies. We have demonstrated that the intense protocol achieves the maximum epithelial purity defined by the highest CD103 + percentage, a CD4 +/CD8 + ratio lower than 0.5, and less adhered epithelium as shown in immunohistochemical staining. None of these criteria were fulfilled using the smooth protocol. Thus, the intense protocol is the method of choice when epithelial lymphocyte isolation is required, even though complete separation was not achieved, as demonstrated by histological analysis. The present study also shows that a CD4 +/CD8 + ratio higher than 1.5 is not an adequate criterion to demonstrate pure lamina propria

compartment fraction, as the smooth epithelial removal protocol achieved this parameter, but immunohistochemistry revealed that epithelium was not removed at all.

The effects of lamina propria lymphocyte isolation protocols are generally validated by using peripheral blood mononuclear cells instead of intestinal biopsies due to the greater ease of handling blood samples. However, cell phenotype, activation status, and response to chemical agents may be different in mucosal cells than in peripheral blood cells, so the validation of the protocol should also be performed in intestinal samples. To our knowledge, comparison of lymphocyte isolation techniques has never been performed to date.

None of the isolation methods achieved a higher yield than that obtained with spontaneous release (overnight incubation without enzymes or biopsy culture). By contrast, the addition

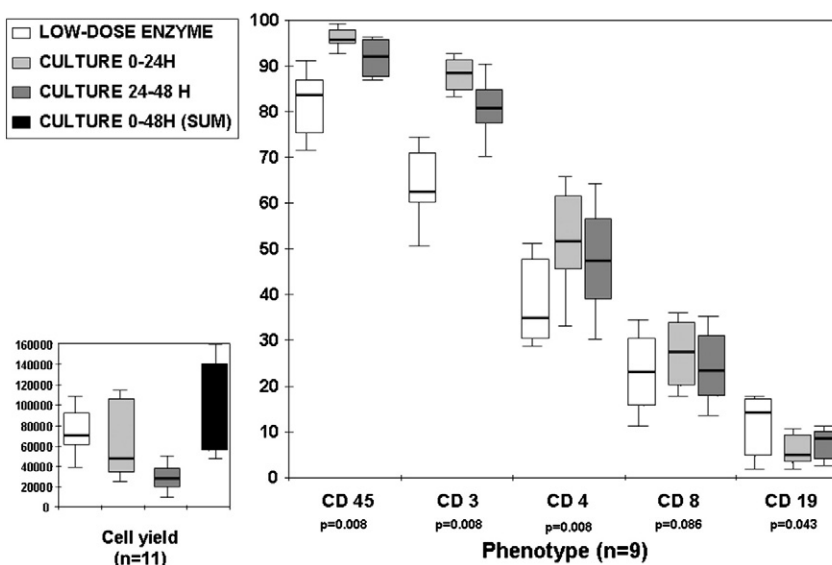


Fig. 7. Results. Left panel: number of lymphocytes isolated per biopsy. The black box represents the sum of the cell yield from the two cultures. Right panel: Flow cytometry phenotypes. Results expressed as median, Interquartile interval (IQI), and limits. LP subsets are relative to CD45 + gated cells.

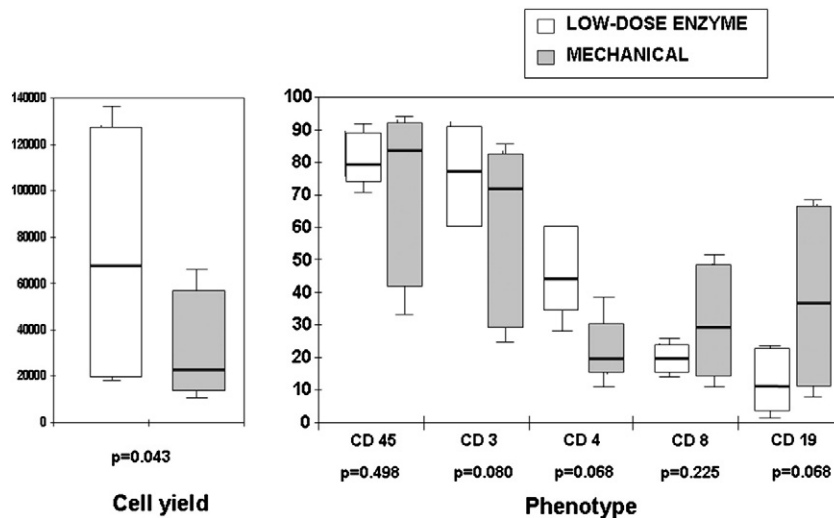


Fig. 8. Results. Left panel: number of lymphocytes isolated per biopsy. Right panel: Flow cytometry phenotypes. Results expressed as median, Interquartile interval (IQI), and limits. LP subsets are relative to CD45 + gated cells.

of a high collagenase dose or mechanical disruption of the mucosa significantly reduced the number of lymphocytes obtained. Moreover, both methods caused great phenotypic disturbances, with a dramatic decrease in CD4+ cells using a high-collagenase dose and an inversion of CD4+/CD8+ ratio and increase of CD19+ cells with mechanicals methods. The disturbances produced by a high-enzymatic dose are of particular note, as this method has been widely used and reported in medical literature (Van Damme et al., 2001).

Culture methods achieved the maximum percentages of the majority of lymphocytes subpopulations analyzed, showing that with this isolation method the minimum amount of debris is swept along, thus permitting easier flow cytometric acquisition. The significant decrease observed in B lymphocytes as compared with overnight methods, with shorter incubation time, is probably due to the conversion of this cell type into plasmatic cells over time. More specific surface analysis for plasma cells (CD38+) should be made to confirm this hypothesis. However, though culture methods achieved the greatest cell purity, their high contamination rate discourages their use. The cell contamination rate could not be avoided by using other antimicrobial strategies such as duplicating the standard dose of the antibiotics referred in the methods or by testing other combinations of antibiotics including gentamicyn.

5. Conclusions

The method of intense epithelial layer removal has demonstrated a greater capacity for intestinal epithelium separation, though an optimum method for epithelium and lamina propria separation has not been described to date. Regarding lamina propria lymphocyte isolation, low-dose enzyme mixture did not cause significant phenotypical alterations and showed a trend toward slightly better cell recovery; for this reason it is the isolation method of choice.

However, overnight culture without enzymes might be a good alternative.

Acknowledgments

The authors thank the nursing team of Nuria Rubies, Maite Roldan, Olga Benitez, Anabel Polo, and Rosa Tomás for helpful technical assistance.

The 'Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd)' is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III, Spain.

References

- Bull, D.M., Bookman, M.A., 1977. Isolation and functional characterization of human intestinal mucosal lymphoid cells. *J. Clin. Invest.* 59, 966.
- Eiras, P., Roldán, E., Camarero, C., Olivares, F., Bootello, A., Roy, G., 1998. Flow cytometry description of a novel CD3+/CD7+ intraepithelial lymphocyte subset in human duodenal biopsies: potential diagnostic value in coeliac disease. *Cytometry* 15, 95.
- Jungblut, M., Oeltze, K., Zehnter, I., Hasselmann, D., Bosio, A., 2008. Preparation of single-cell suspensions from mouse spleen with the gentleMACS Dissociator. *J. Vis. Exp.* 11, 1029.
- Mahida, Y.R., Galvin, A.M., Gray, T., Makh, S., McAlindon, M.E., Sewell, H.F., Podolsky, D.K., 1997. Migration of human intestinal lamina propria lymphocytes, macrophages and eosinophils following the loss of surface epithelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* 109, 377.
- Mañé, J., Pedrosa, E., Lorén, V., Ojanguren, I., Fluvià, L., Cabré, E., Rogler, G., Gassull, M.A., 2009. Partial replacement of dietary (n-6) fatty acids with medium-chain triglycerides decreases the incidence of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice. *J. Nutr.* 139, 603.
- McAlindon, M.E., Gray, T., Galvin, A., Sewell, H.F., Podolsky, D.K., Mahida, Y.R., 1998. Differential lamina propria cell migration via basement membrane pores of inflammatory bowel disease mucosa. *Gastroenterology* 115, 841.
- Santaolalla, R., Mañé, J., Pedrosa, E., Lorén, V., Fernández-Bañares, F., Mallolas, J., Carrasco, A., Salas, A., Rosinach, M., Forné, M., Espinós, J.C., Loras, C., Donovan, M., Puig, P., Mañosa, M., Gassull, M.A., Viver, J.M., Esteve, M., 2011. Apoptosis resistance of mucosal lymphocytes and IL-10 deficiency in patients with steroid-refractory Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 17, 1490.

- Selby, W.S., Janossy, G., Bofill, M., Jewell, D.P., 1984. Intestinal lymphocyte subpopulations in inflammatory bowel disease: an analysis by immunohistological and cell isolation techniques. *Gut* 25, 32.
- Van Damme, N., Baeten, D., De Vos, M., Demetter, P., Elewaut, D., Mielants, H., Verbruggen, G., Cuvelier, C., Veys, E.M., De Keyser, F., 2000. Chemical agents and enzymes used for the extraction of gut lymphocytes influence flow cytometric detection of T cell surface markers. *J. Immunol. Methods* 236, 27.
- Van Damme, N., De Vos, M., Baeten, D., Demetter, P., Mielants, H., Verbruggen, G., Cuvelier, C., Veys, E.M., De Keyser, F., 2001. Flow cytometric analysis of gut mucosal lymphocytes supports an impaired Th1 cytokine profile in spondyloarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 60, 495.
- Veny, M., Esteller, M., Ricart, E., Piqué, J.M., Panés, J., Salas, A., 2010. Late Crohn's disease patients present an increase in peripheral Th17 cells and cytokine production compared with early patients. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 31, 561.
- Weigmann, B., Tubbe, I., Seidel, D., Nicolaev, A., Becker, C., Neurath, M.F., 2007. Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue. *Nat. Protoc.* 2, 2307.

Mètodes de treball amb cèl·lules del sistema digestiu: aïllament de limfòcits intestinals

Anna Carrasco

Servei d'Aparell Digestiu. Laboratori de Recerca. Fundació per a la Recerca i la Docència Mútua de Terrassa. Hospital Universitari Mútua de Terrassa.

Introducció

El sistema immunitari del tracte digestiu interacciona amb una gran càrrega antigènica, procedent de la dieta i de la microbiota i posseeix la major quantitat i diversitat de cèl·lules immunitàries de tot l'organisme¹. La seva funció consisteix en l'adquisició de tolerància envers nutrients i microbiota i la lluita envers patògens. Per dur-la a terme s'ha desenvolupat un sistema molt complex i especialitzat, que està "en alerta" permanent, donant lloc al que es coneix com a *inflamació fisiològica*².

Limfòcits intestinals

Els limfòcits intraepiteliais (LIE) es localitzen entre els enteròcits, al costat de la membrana basal. El nombre major de LIE a la mucosa sana és al duodè (10-15 LIE per 100 enteròcits) i es redueix en sentit distal (5-8 LIE per 100 enteròcits al còlon). El seu fenotip majoritari és CD3⁺CD8⁺TCRαβ⁺. Una minoria (1-7%) dels LIE de mucosa sana presenta el TCR atípic γδ. El % de CD103, que és un marcador de LIE, també és màxim al duodè (≥ 90%) i decreix progressivament cap al còlon. A més de limfòcits T convencionals (CD3⁺), l'epiteli conté una població molt heterogènia i pobrament descrita de cèl·lules CD7⁺CD3⁻³.

La làmina pròpia (LP) és el teixit connectiu que es troba sota l'epiteli intestinal i conté múltiples subtipus de limfòcits de làmina pròpia (LLP), incloent limfòcits T, B, i cèl·lules limfoides innates (*innate lymphoid cells*, ILC). Dins els LLP, els CD4⁺ predominen sobre els CD8⁺ en nombre. El seu fenotip és molt divers, existeixen múltiples subpoblacions (Th1, Th17, Th22, Treg, iNK, etc.), que demostren fenòmens de plasticitat cel·lular que permeten "intercanviar" funcionalitat i fenotip per cobrir les necessitats d'homeòstasi de cada moment.

Els fenotips descrits en LIE i LLP són molt diversos, i varien amb l'edat⁴, el sexe⁵ i les diferents patologies intestinals¹. Dins de cada patologia digestiva, a més del patró fenotípic característic de cada malaltia, es produeixen canvis en el patró segons els diferents estadis (precoç vs. tardà⁶), entre moments de brot o remissió⁷ i induïts pels fàrmacs emprats per al control de la malaltia⁸ i segons la resposta a aquests⁹.

Molts estudis han ignorat el fet que el tracte digestiu comprèn regions molt diferenciades, amb característiques anatòmiques i fisiològiques dispars. Aquest fenomen és es-

pecialment rellevant quan s'estudia la fisiopatologia de malalties que poden afectar a qualsevol tram de l'intestí com la malaltia de Crohn. Una excel·lent revisió recent descriu l'especialització regional observada al llarg de l'intestí de cèl·lules del sistema immunitari innat, adaptatiu i *innate-like*¹. La distribució i el fenotip dels limfòcits intestinals depèn, en gran mesura, de la microbiota intestinal. De fet, els nivells de Treg, Th22 i Th17 són més elevats al cec, on la diversitat bacteriana és màxima, en comparació amb l'ili terminal o altres regions del budell gros¹⁰.

Aïllament de limfòcits intestinals

Peça quirúrgica o biòpsia endoscòpica?

La majoria d'estudis han fet servir peces quirúrgiques procedents de resecció intestinal per a l'estudi de patologia digestiva, emprant els marges "sans" de cirurgia de càncer colorectal com a control sa. Aquesta aproximació té un avantatge evident: una gran quantitat de teixit disponible que permet obtenir un gran rendiment cel·lular per a l'anàlisi posterior. Els inconvenients de l'ús de peça són múltiples. Els individus que se sotmeten a resecció intestinal pateixen formes molt greus de malaltia i han estat multitractats (i habitualment han fracassat a tots els tractaments farmacològics). Per tant, l'estudi de peça quirúrgica no permet caracteritzar les fases inicials o més benignes d'una malaltia ni permet trobar biomarcadors precoços de bona resposta al tractament. L'estudi de biòpsia endoscòpica, en canvi, permet la presa de mostres en tots els estadis de la malaltia, incloent períodes de remissió i permet la realització d'estudis topogràfics que avaluin les diferències entre compartiments intestinals, tant en mucosa sana com en malalties inflamatores intestinals. Els inconvenients principals de les biòpsies endoscòpiques són la mida i el baix rendiment cel·lular que ofereixen.

Mètodes de separació d'epiteli i LIE

La separació de la fracció epitelial i l'LP és relativament senzilla, malgrat que no hi ha cap mètode que garanteixi una total separació de compartiments¹¹. La *deseptelització* es realitza mitjançant incubació en agitació en solució salina o medi de cultiu suplementat amb 10% d'FBS i 1 mM de quelants de calci (habitualment DTT i EDTA, malgrat alguns grups fan servir EGTA enlloc d'EDTA). Els quelants

de calci trenquen les unions entre les cèl·lules epitelials, i afavoreixen així el seu alliberament¹². L'efecte químic dels quelants de calci per si sol és insuficient, és essencial afegir-hi algun tipus d'efecte mecànic (agitador orbital, magnètic, etc.). Aquest procediment es pot realitzar a 37 °C o a temperatura ambient (mai a 4 °C¹²). El temps és variable, en només 15 minuts comença a desprendre's l'epiteli. L'alliberament cel·lular s'inicia a la punta de les vellositats i continua distalment. Difícilment aconseguirem desprendre l'epiteli del fons de les criptes. Incubacions més llargues (60-90 min) ens permeten obtenir un major nombre de cèl·lules (i per tant reduir el nombre de biòpsies necessàries), però també implicarà una menor puresa de la fracció aïllada, per increment de la contaminació procedent d'LP. S'ha d'assolir, per tant, un compromís entre el nombre de cèl·lules desitjat i el grau de contaminació d'LP que podem assumir. Aquests mètodes en general funcionen molt millor en biòpsies duodenals en comparació amb biòpsies d'ili o còlon.

Mètodes d'aïllament d'LLP

No existeix un mètode únic i estandaritzat d'aïllament d'LLP. A la literatura trobem diverses metodologies, totes amb avantatges i inconvenients. L'elecció final dependrà de les possibilitats tècniques i econòmiques del laboratori i de l'aplicació que es farà posteriorment amb les cèl·lules aïllades. En qualsevol cas, és imprescindible conèixer les limitacions de cadascuna de les tècniques i tenir en compte que mostres aïllades per diferents procediments no poden ser comparades entre si.

- **Cultiu de biòpsia (walk-out):** aquesta és la tècnica menys agressiva de totes, i consisteix en deixar migrar lliurement les cèl·lules mononuclears mantenint el teixit en medi complet en una cambra de cultiu (37 °C, 5% CO₂) durant 24, 48 o 72 h. La migració té lloc a través de porus de petita mida (< 4 µm) presents a la membrana basal que separa l'epiteli d'LP¹³. L'obtenció de limfòcits és màxima en el període 0-24 h i decreix en períodes posteriors^{11,13}. L'inconvenient principal d'aquest mètode és l'elevada taxa de contaminació en mostres de còlon (33% a les 24 h i 66% a les 48 h) deguda a la microbiota¹¹. Les mostres ileals o duodenals rarament es contaminen, ja que la majoria de bacteris són anaerobis. En canvi, aquest és el mètode que ofereix millors resultats per a la posterior citometria de flux, ja que la quantitat de detritus o restes de teixit és mínima. A més, en no fer servir cap enzim o agent químic, els marcadors de superfície no es veuen alterats.
- **Mètodes enzimàtics:** tradicionalment, l'aïllament de limfòcits d'LP s'ha realitzat mitjançant incubacions breus (20 min - 2 h) amb dosis molt elevades de col·lagenasa IV o V. Si bé aquest mètode ens permet obtenir cèl·lules en un termini de temps molt breu, no podem menysprear l'insult "químic" que produeix una

dosi tan elevada, que causa una reducció significativa del marcador de superfície CD4^{11,14}, tant en % com en intensitat de fluorescència. En canvi, l'ús d'un *cocktail* enzimàtic a concentracions molt baixes (0,5 µg/mL de col·lagenasa V, hialuronidasa i deoxiribonucleasa) en incubació *overnight* en agitació a 37 °C permet l'obtenció d'una suspensió cel·lular sense alteracions en la viabilitat (≥ 95%) ni en el fenotip de membrana¹¹. Aquest mètode millora discretament el rendiment en nombre de cèl·lules respecte de la incubació sense l'ús d'enzims¹¹, i ha demostrat oferir molt bons resultats per l'anàlisi funcional, tant en biòpsies de còlon humà¹⁵ com en còlon de ratolí¹⁶.

- **Mètodes mecànics:** en la nostra experiència, els mètodes mecànics no són aconsellables per a l'aïllament d'LLP de biòpsies endoscòpiques, ja que ocasionen una inversió de les ràtio CD4+/CD8+ i tenen un rendiment cel·lular significativament inferior al que s'obté mitjançant els mètodes descrits prèviament¹¹.

Difícultats i consideracions metodològiques

Tal i com s'ha comentat repetidament, un factor limitant crític en l'ús de biòpsies endoscòpiques és el baix rendiment obtingut en nombre de cèl·lules. A més, no s'han de menysprear les pèrdues ocasionades per la manipulació. Per a minimitzar-les, convé reduir els protocols als mínims passos indispensables. Amb cada rentat es perd un 10-15% de les cèl·lules inicials mentre que la purificació per centrifugació amb gradients de densitat (*Fycoll* o *Percoll*) ocasiona pèrdues que poden arribar al 60%^{11,17}, i per tant és millor prescindir-ne. Altres dificultats característiques de les mostres intestinals són la contaminació dels cultius *in vitro* i l'elevada autofluorescència pròpia dels teixits que en dificulta l'anàlisi per citometria de flux.

A més, no hem d'oblidar que tots els reactius químics que fem servir durant la manipulació produeixen alteracions en el fenotip i la funcionalitat de les cèl·lules¹⁸. És freqüent trobar a la literatura resultats aparentment contradictoris sobre la presència i la funcionalitat de LIE i LLP en diferents situacions. Això pot ser en part degut a la inclusió de pacients diferents (diferent grau d'activitat, tractament rebut, etc.) però també per l'efecte dels mètodes emprats, que poden modificar el fenotip i la funció de les cèl·lules analitzades. Els resultats que obtenim després de múltiples manipulacions no són necessàriament representatius del que succeeix *in vivo* a la mucosa¹⁷. Per tant, sempre hem de ser molt prudents en la interpretació dels resultats. És molt recomanable fer servir múltiples tècniques per a la corroboració de resultats.

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

1. Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(10):667-85.
2. Fiocchi C. What is "physiological" intestinal inflammation and how does it differ from "pathological" inflammation? *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14 (Suppl 2):S77-8.

3. Eiras P, Roldán E, Camarero C, Olivares F, Bootello A, Roy G. Flow cytometry description of a novel CD3-/CD7+ intraepithelial lymphocyte subset in human duodenal biopsies: potential diagnostic value in coeliac disease. *Cytometry*. 1998;34(2):95-102.
4. Camarero C, Leon F, Sanchez L, Asensio A, Roy G. Age-related variation of intraepithelial lymphocytes subsets in normal human duodenal mucosa. *Dig Dis Sci*. 2007;52(3):685-91.
5. Sankaran-Walters S, Macal M, Grishina I, Nagy L, Goulart L, Coolidge K, et al. Sex differences matter in the gut: effect on mucosal immune activation and inflammation. *Biol Sex Differ*. 2013;4(1):10.
6. Veny M, Esteller M, Ricart E, Pique JM, Panes J, Salas A. Late Crohn's disease patients present an increase in peripheral Th17 cells and cytokine production compared with early patients. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010;31(5):561-72.
7. Holmén N, Lundgren A, Lundin S, Bergin AM, Rudin A, Sjövall H, et al. Functional CD4+CD25high regulatory T cells are enriched in the colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and increase with disease activity. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12(6):447-56.
8. Ricciardelli I, Lindley KJ, Londei M, Quarantino S. Anti tumour necrosis-alpha therapy increases the number of FOXP3 regulatory T cells in children affected by Crohn's disease. *Immunology*. 2008;125(2):178-83.
9. Li Z, Arijs I, De Hertogh G, Vermeire S, Noman M, Bullens D, Coorevits L, et al. Reciprocal changes of Foxp3 expression in blood and intestinal mucosa in IBD patients responding to infliximab. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16(8):1299-310.
10. Wolff MJ, Leung JM, Davenport M, Poles MA, Cho I, Loke P. TH17, TH22 and Treg cells are enriched in the healthy human cecum. *PLoS One*. 2012;7(7):e41373.
11. Carrasco A, Mañé J, Santaolalla R, Pedrosa E, Mallolas J, Lorén V, et al. Comparison of lymphocyte isolation methods for endoscopic biopsy specimens from the colonic mucosa. *J Immunol Methods*. 2013;389(1-2):29-37.
12. Leon F. Flow cytometry of intestinal intraepithelial lymphocytes in celiac disease. *J Immunol Methods*. 2011;363(2):177-86.
13. Mahida YR, Galvin AM, Gray T, Makh S, McAlindon ME, Sewell HF, et al. Migration of human intestinal lamina propria lymphocytes, macrophages and eosinophils following the loss of surface epithelial cells. *Clin Exp Immunol*. 1997;109(2):377-86.
14. Grange C, Letourneau J, Forget MA, Godin-Ethier J, Martin J, Liberman M, et al. Phenotypic characterization and functional analysis of human tumor immune infiltration after mechanical and enzymatic disaggregation. *J Immunol Methods*. 2011;372(1-2):119-26.
15. Santaolalla R, Mañé J, Pedrosa E, Lorén V, Fernández-Bañares F, Mallolas J, et al. Apoptosis resistance of mucosal lymphocytes and IL-10 deficiency in patients with steroid-refractory Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(7):1490-500.
16. Mane J, Pedrosa E, Loren V, Ojanguren I, Fluvia L, Cabre E, et al. Partial replacement of dietary (n-6) fatty acids with medium-chain triglycerides decreases the incidence of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice. *J Nutr*. 2009;139(3):603-10.
17. 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.
18. Van Damme N, Baeten D, De Vos M, Demetter P, Elewaut D, Mielants H, et al. Chemical agents and enzymes used for the extraction of gut lymphocytes influence flow cytometric detection of T cell surface markers. *J Immunol Methods*. 2000;236(1-2):27-35.

ANNEX 2. Fonts de finançament

Aquest treball s'ha pogut dur a terme gràcies a les següents ajudes a la investigació:

ESTUDI 1:

Projecte: Anàlisi fenotípic i apoptosi de cèl·lules implicades a la resposta immunitària de la Malaltia Inflammatory Intestinal (BFU-2007-64887-BFI)

Projecte: Paper de la Interleucina 10 (IL10) a la fisiopatologia de la refractarietat a fàrmacs a la Malaltia de Crohn. Relació amb la apoptosi de limfòcits T i B i capacitat de predicció de la resposta als esteroides (BFU-2010-19888-BFI)

Investigadora Principal: Maria Esteve Comas

Finançament: Ministerio de Educación y Ciencia

ESTUDI 2:

Projecte: Caracterització de les poblacions limfocitàries a la mucosa de còlon de pacients amb colitis col·làgena i colitis limfocítica. Valoració de la presència de cèl·lules Treguladores FOXP3+ i de limfòcits productors de citocines.

Investigador Principal: Fernando Fernández-Bañares

Finançament: Acadèmia de Ciències Mèdiques de Catalunya i Balears

ANNEX 3. Llicències per a l'ús de figures

Figura 2

NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

May 03, 2016

This is a License Agreement between Anna Carrasco ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3861421478672
License date	May 03, 2016
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature Reviews Immunology
Licensed content title	Regional specialization within the intestinal immune system
Licensed content author	Allan M. Mowat, William W. Agace
Licensed content date	Sep 19, 2014
Volume number	14
Issue number	10
Type of Use	reuse in a dissertation / thesis
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Figures	Figure 2 Distribution of environmental factors along the length of the intestine
Author of this NPG article	no
Your reference number	None
Title of your thesis / dissertation	Equilibri entre la resposta immunitària efectora i reguladora a l'intestí humà sa i inflammat. Relació amb la localització i el tipus de malaltia.
Expected completion date	Jun 2016
Estimated size (number of pages)	200
Customer Tax ID	ESG62331673
Total	0,00 EUR
Terms and Conditions	

Figura 3

License Number	3861440354667
License date	May 03, 2016
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Immunological Reviews
Licensed Content Title	The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system
Licensed Content Author	Thaher Pelaseyed,Joakim H. Bergström,Jenny K. Gustafsson,Anna Ermund,George M. H. Birchenough,André Schütte,Sjoerd Post,Frida Svensson,Ana M. Rodríguez-Piñeiro,Elisabeth E. L. Nyström,Catharina Wising,Malin E. V. Johansson,Gunnar C. Hansson
Licensed Content Date	Jun 19, 2014
Pages	13
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Original Wiley figure/table number(s)	Figure 1. Schematic representation of the gastrointestinal mucus system.
Will you be translating?	No
Title of your thesis / dissertation	Equilibri entre la resposta immunitària efectora i reguladora a l'intestí humà sa i inflammat. Relació amb la localització i el tipus de malaltia.
Expected completion date	Jun 2016
Expected size (number of pages)	200
Requestor Location	Anna Carrasco Sant Antoni 19 Terrassa, Spain 08221 Attn: Anna Carrasco
Customer VAT ID	ESG62331673
Billing Type	Invoice
Billing Address	Anna Carrasco Sant Antoni 19

Figura 4

License Number	3861950600676
License date	May 04, 2016
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Journal of Internal Medicine
Licensed Content Title	Targeting T-cell migration in inflammatory bowel disease
Licensed Content Author	J. Marsal,W. W. Agace
Licensed Content Date	Oct 15, 2012
Pages	19
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Original Wiley figure/table number(s)	Figure 5 Morphological macroscopic and microscopic features of inflammatory bowel disease
Will you be translating?	No
Title of your thesis / dissertation	Equilibri entre la resposta immunitària efectora i reguladora a l'intestí humà sa i inflammat. Relació amb la localització i el tipus de malaltia.
Expected completion date	Jun 2016
Expected size (number of pages)	200
Requestor Location	Anna Carrasco Sant Antoni 19 Terrassa, Spain 08221 Attn: Anna Carrasco

Figura 6

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3864100062779
License date	May 08, 2016
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology
Licensed content title	Immunopathogenesis of IBD: current state of the art
Licensed content author	Heitor S. P. de Souza, Claudio Fiocchi
Licensed content date	Dec 2, 2015
Volume number	13
Issue number	1
Type of Use	reuse in a dissertation / thesis
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Figures	The intricate universe of immune and nonimmune components involved in IBD immunopathogenesis
Author of this NPG article	no
Your reference number	Figure 3
Title of your thesis / dissertation	Equilibri entre la resposta immunitària efectora i reguladora a l'intestí humana i inflamada. Relació amb la localització i el tipus de malaltia.
Expected completion date	Jun 2016
Estimated size (number of pages)	200
Customer Tax ID	ESG62331673
Total	0.00 EUR

**ANNEX 4. Comunicacions a congressos
internacionals relacionades amb la tesi**

CELL ISOLATION AND PURIFICATION METHODS FROM ENDOSCOPIC BIOPSY SPECIMENS

A Carrasco¹, J Mañé², E Pedrosa², J Vidal³, M Fernandez², R Santaolalla¹, J Mallolas¹, V Lorén², F Fernández-Bañares¹, C Loras¹, M Rosinach¹, JC Espinós¹, A Robles¹, L Pardo¹, JM Viver¹, M Esteve¹

1. Gastroenterology Department. Hospital Universitari Mútua Terrassa. Fundació per a la Recerca Mútua Terrassa. (Catalonia, Spain)
2. Gastroenterology Department. Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, CIBERehd (Catalonia, Spain)
3. cFlow cytometry Department, Catlab (Terrassa, Catalonia, Spain)

INTRODUCTION

- Immune cell isolation methods are essential in physiopathological studies
- An ideal method should provide the maximum cell yield without the modification of functional properties of isolated cells.
- There are no standardized optimized protocols for lymphocyte isolation.
- Comparative methodological studies have never been performed

AIM

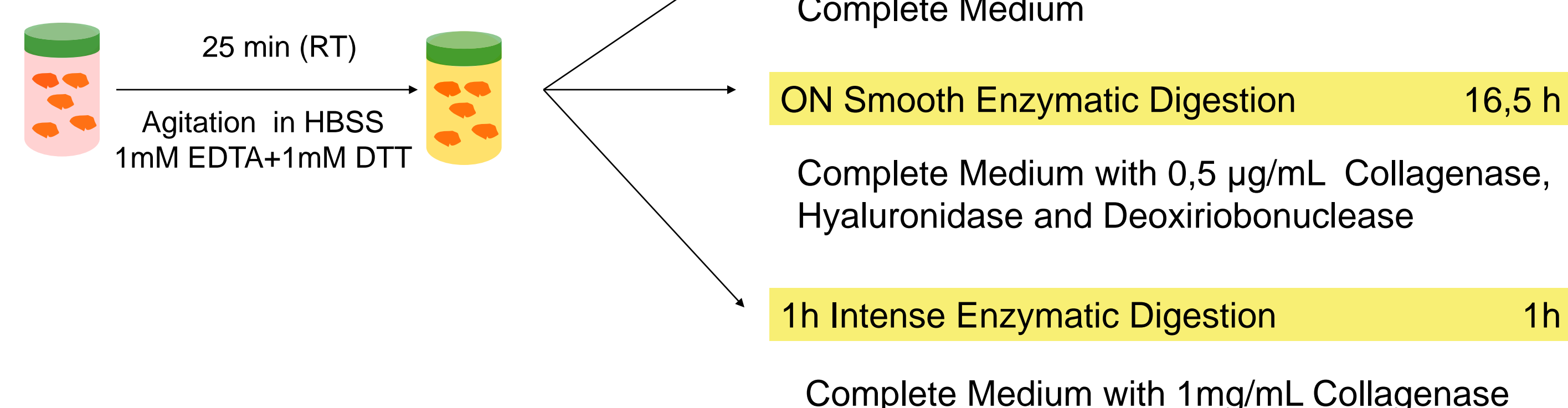
To compare 5 different Cell Isolation Protocols from colonic biopsy specimens, analyzing:

- Lymphocyte number and viability
- Lymphocyte phenotype and purity

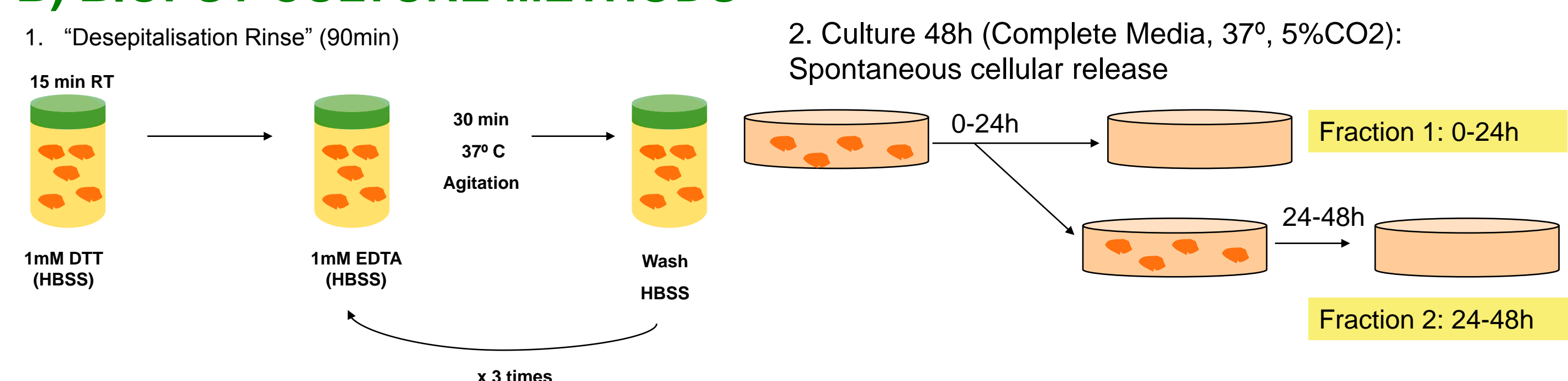
METHODS

ISOLATION METHODS:

A) ENZYMATIC METHODS



B) BIOPSY CULTURE METHODS



C) MECHANICAL METHODS



Manual and Automated Tissue Dissociators were used, Following manufacturer instructions

PATIENTS:

10-20 biopsy specimens were obtained from 27 patients without inflammatory conditions during colonoscopy

CELLULAR ANALYSIS:

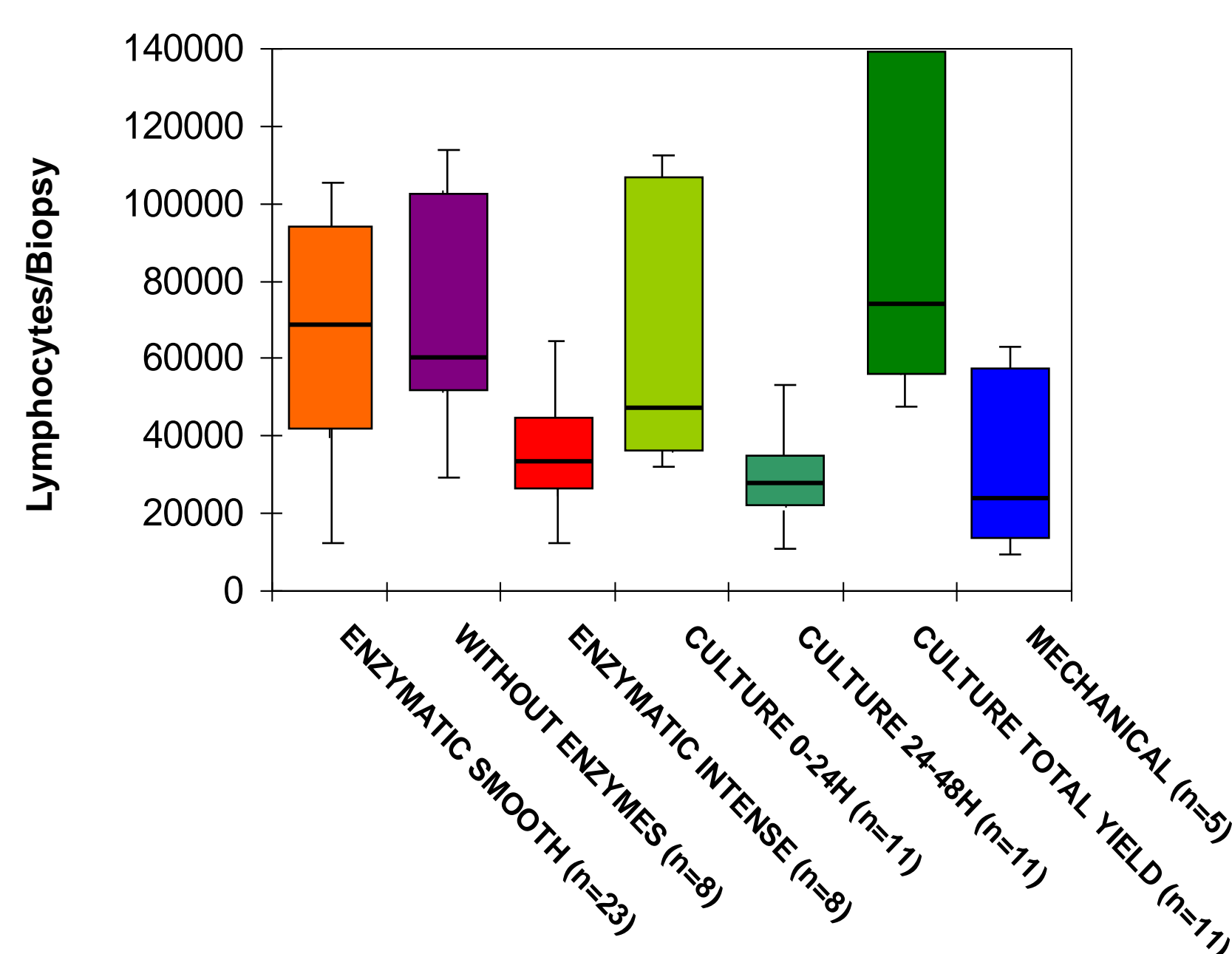
- Cell yield: Absolute Count (Neubauer Chamber). Expressed as number of lymphocytes obtained per biopsy
- Cell Viability: Trypan Blue Exclusion. Samples with viability $\leq 80\%$ were excluded
- Cell Phenotype:
 - Biopsy: Hematoxylin&Eosin; Immunohistochemistry CD3 (Dako)
 - Lymphocyte Suspension: Flow Cytometry (FACSCalibur; Becton Dickinson):
 - CD45-Leucocyte
 - CD19-B Lymphocyte
 - CD3-T Lymphocyte: CD4 and CD8 subpopulations

STATISTICAL ANALYSIS:

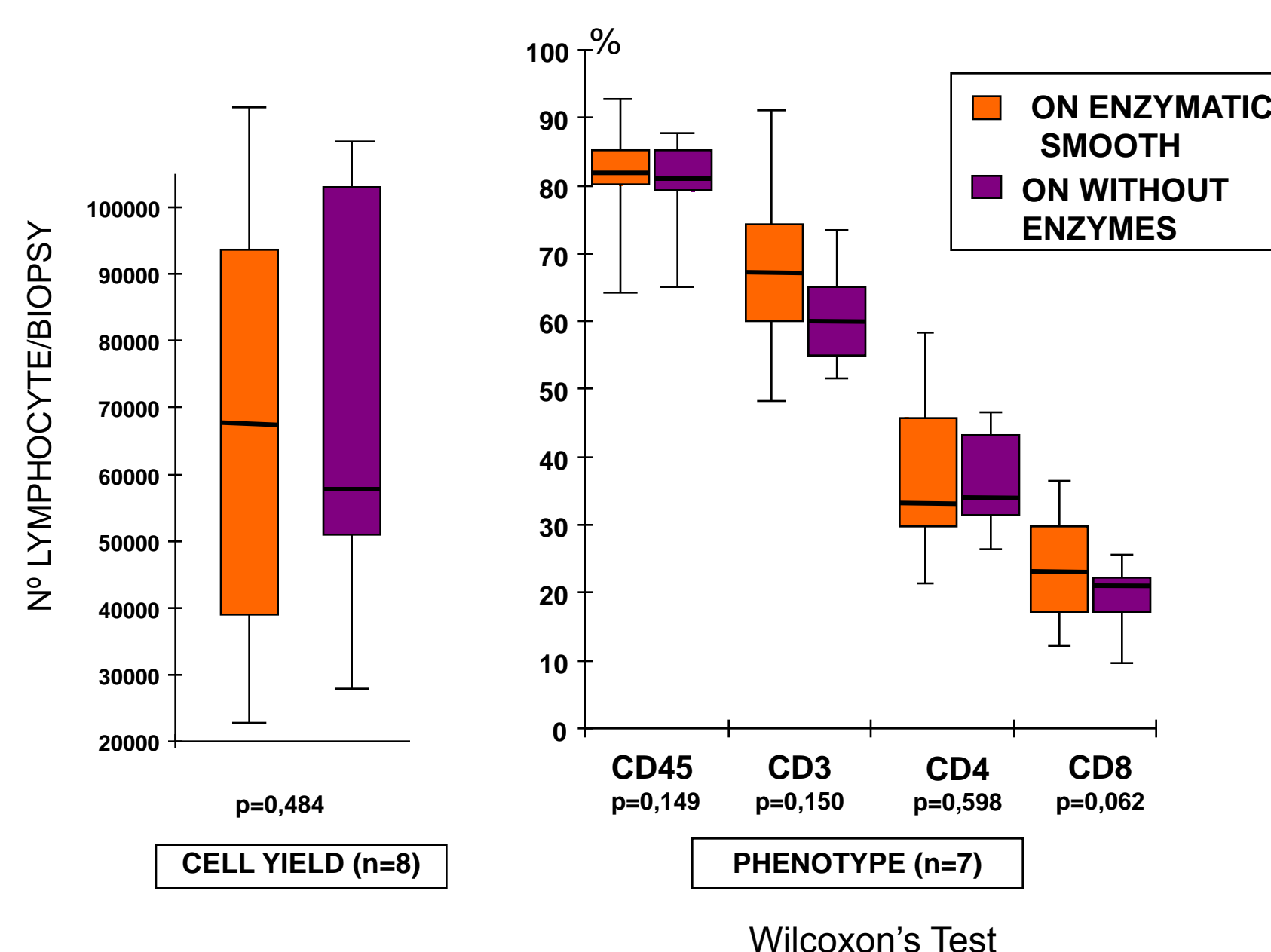
- Results expressed as non parametrical measurements: Median (InterQuartileInterval)
- Non parametrical statistical Tests were used:
 - U Mann Whitney Test (unpaired data)
 - Wilcoxon Test (Paired data)
- Significant results if $p < 0,05$

RESULTS

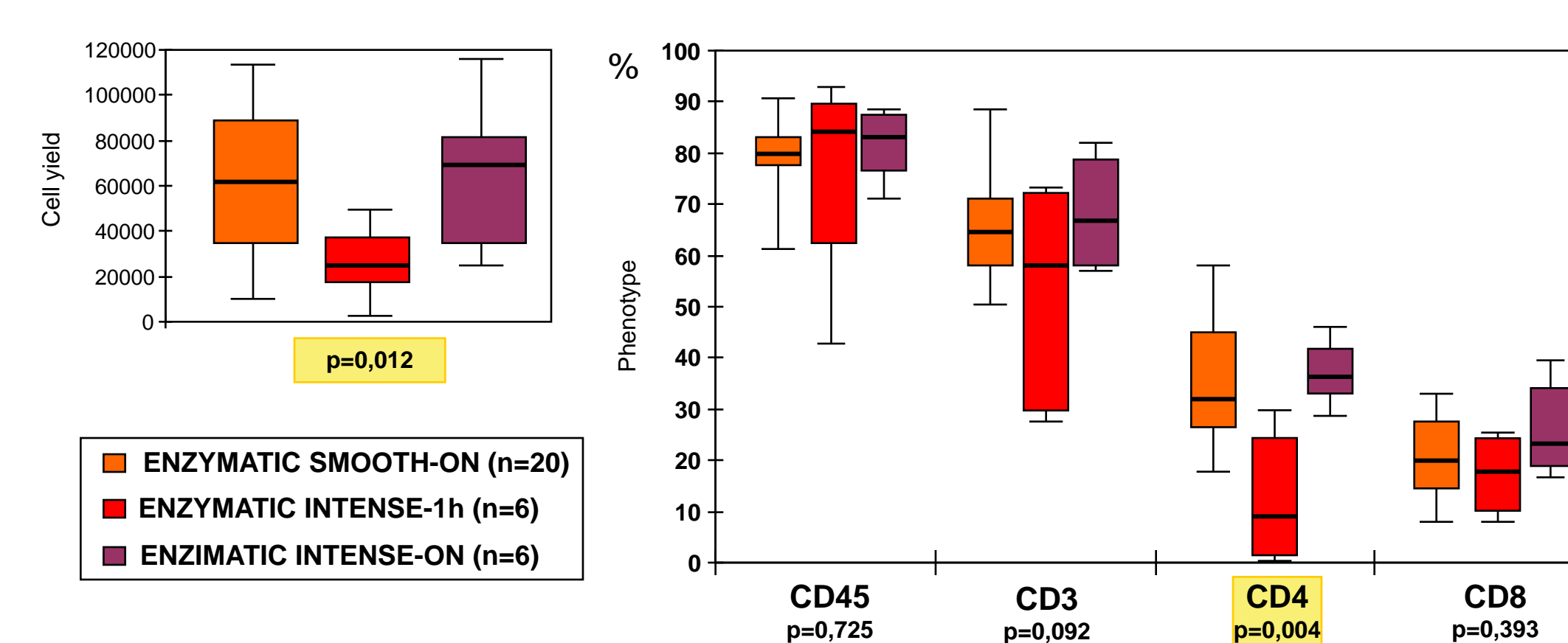
CELL YIELD:



ENZYMATIC SMOOTH vs ON WITHOUT ENZYMES:

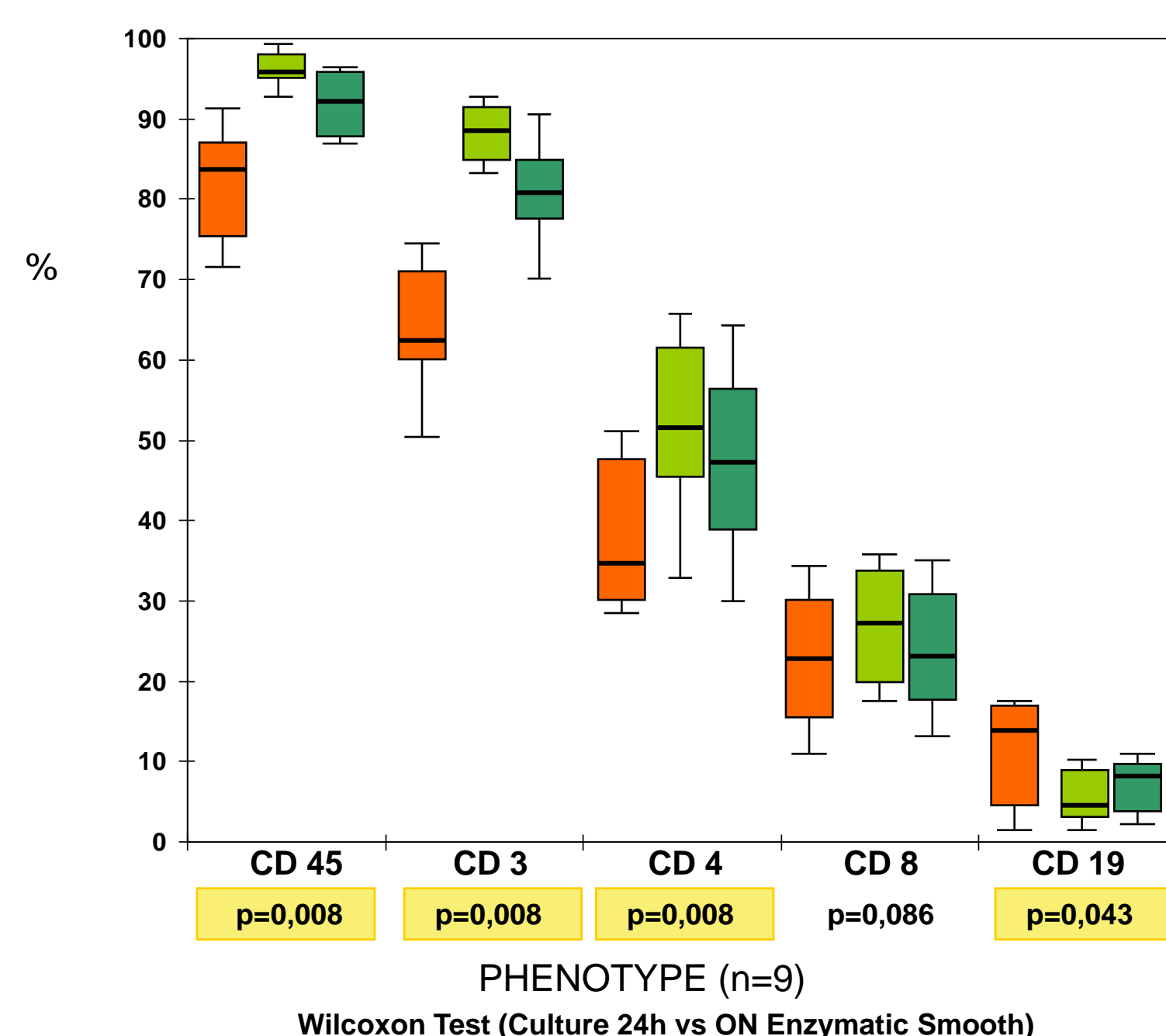
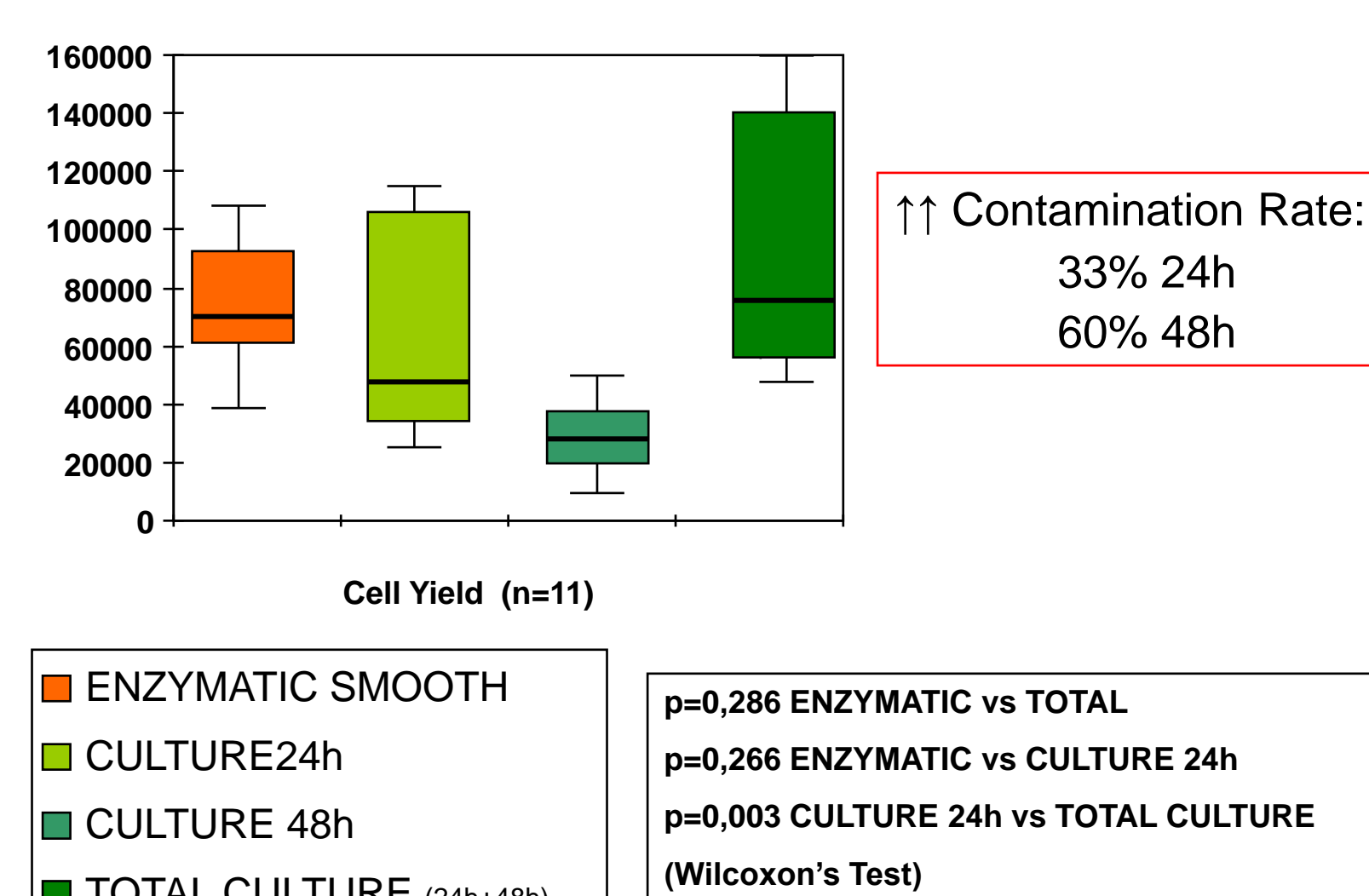


ENZYMATIC SMOOTH vs ENZYMATIC INTENSE:

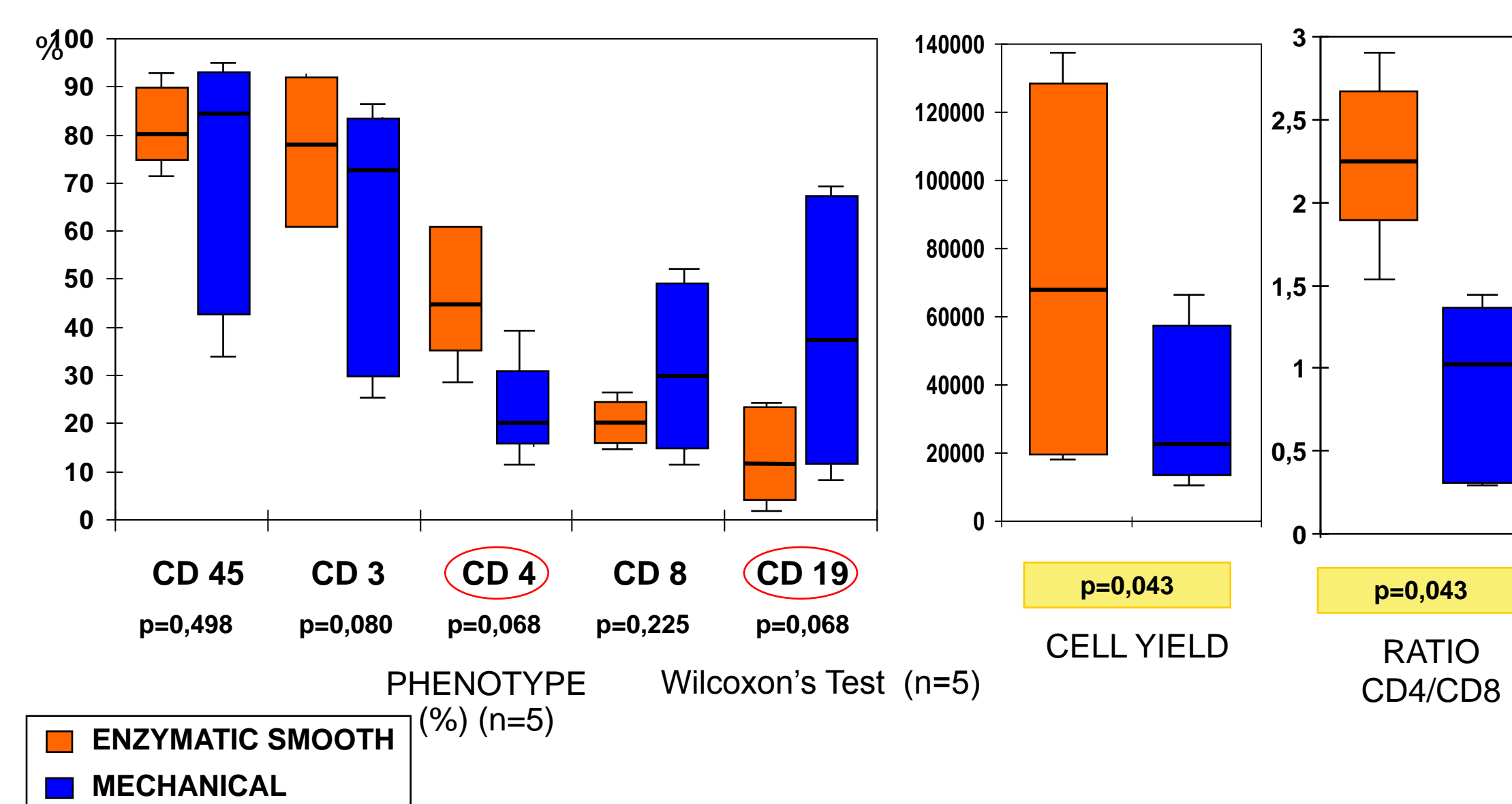


- Mann-Whitney Test (ON Smooth vs Intense 1h)
- 1h incubation with 1mg/mL Collagenase caused a significant decrease in CD4+ T lymphocytes. When biopsies were incubated overnight without enzymes, CD4+ population recovered physiological values

ENZYMATIC SMOOTH vs BIOPSY CULTURE:



ENZYMATIC SMOOTH vs MECHANICAL:



CONCLUSIONS

- ✓ High dose collagenase incubation causes a dramatic decrease in CD4+ cells without a better cell recovering
- ✓ Biopsy culture method is not advisable because of the high contamination rate
- ✓ Mechanical dissociation methods are not advisable because of the low cell yield, while causing abnormalities in lymphocytic phenotype.
- ✓ Maximum cell yield without phenotypic modification was obtained with the ON smooth enzymatic digestion.

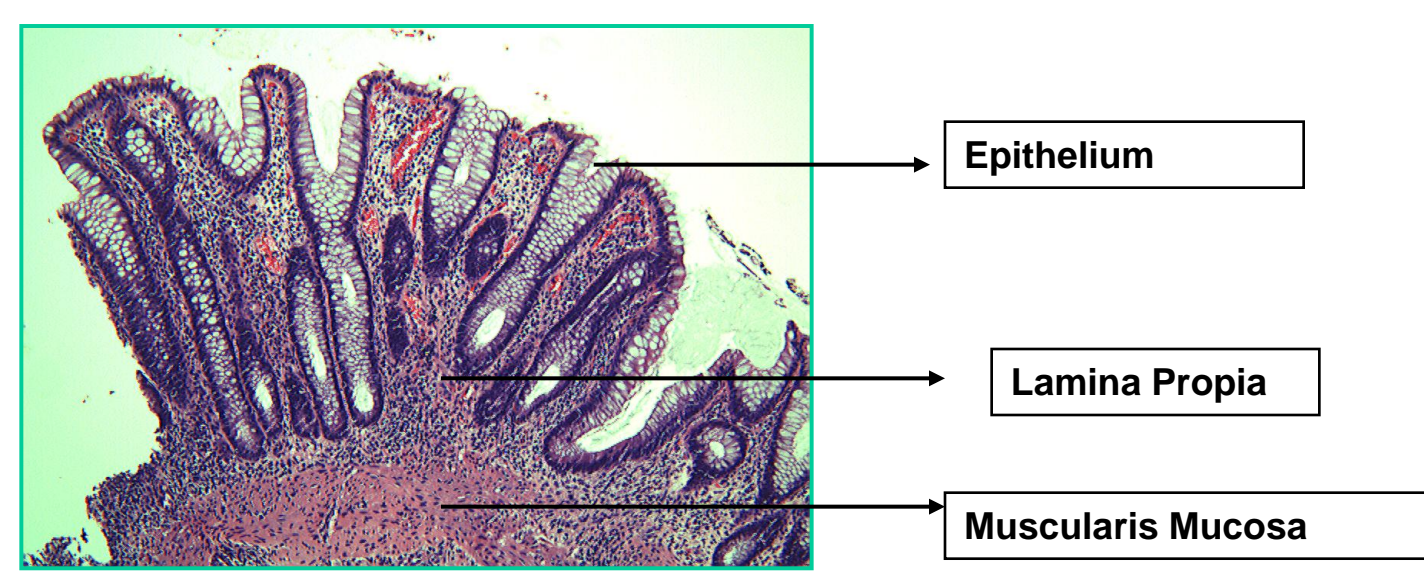
COMPARISON OF TWO DESEPITELIZATION PROTOCOLS FROM ENDOSCOPIC BIOPSY SPECIMENS

A Carrasco¹, J Mañé², J Vidal³, R Santaolalla¹, E Pedrosa², J Mallolas¹, V Lorén², M Fernandez², A Robles¹, F Fernández-Bañares¹, M Rosinach¹, C Loras¹, M Forné¹, X Andújar¹, JM Viver¹, M Esteve¹

1. Gastroenterology Department. Hospital Universitari Mútua Terrassa. Fundació per a la Recerca Mútua Terrassa (Catalonia, Spain)
2. Gastroenterology Department. Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, CIBERehd. Badalona (Catalonia, Spain)
3. Flow Cytometry Department, Catlab. Terrassa (Catalonia, Spain)

INTRODUCTION

- Intestinal mucosa is divided into two immune compartments: Epithelium (EP) and Lamina Propria (LP)
- Its separation has special relevance in research, as the two fractions have different immune functions



Healthy colon biopsy, Hematoxylin&Eosin Staining (4x)

CHARACTERISTICS OF BOTH COMPARTEMENTS: SEPARATION METHODS ACCORDING TO LITERATURE:

PHENOTYPE	EPITHELIUM	LAMINA PROPIA
Main Lymphocytes	Intraepithelial Lymphocytes (IELs, CD8+)	Lamina Propria Lymphocytes (LPLs, CD4+)
CD4/CD8 Ratio	< 0,5	> 1,5
Integrin $\alpha E\beta 7$ (CD-103)	+	-
Integrin $\alpha 4\beta 7$	-	+

Ion chelation for epithelium separation:

- DTT: Reducing agent for faecal material removal
- EDTA: Calcium chelation for epithelium separation

Enzymes for Lamina Propria disaggregation:

- COLLAGENASE TREATMENT

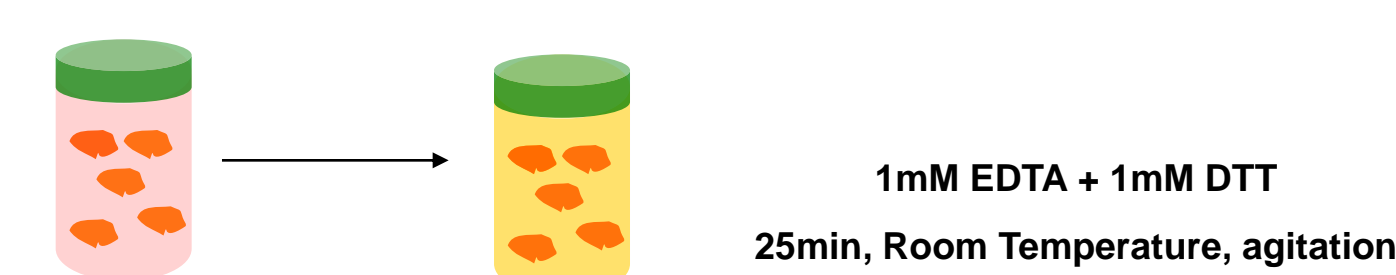
AIM

To assess the efficiency regarding cell yield and phenotype obtained of two distinct protocols in separation of intraepithelial lymphocytes (IEL) and LP lymphocytes (LPL) from colonic biopsy specimens.

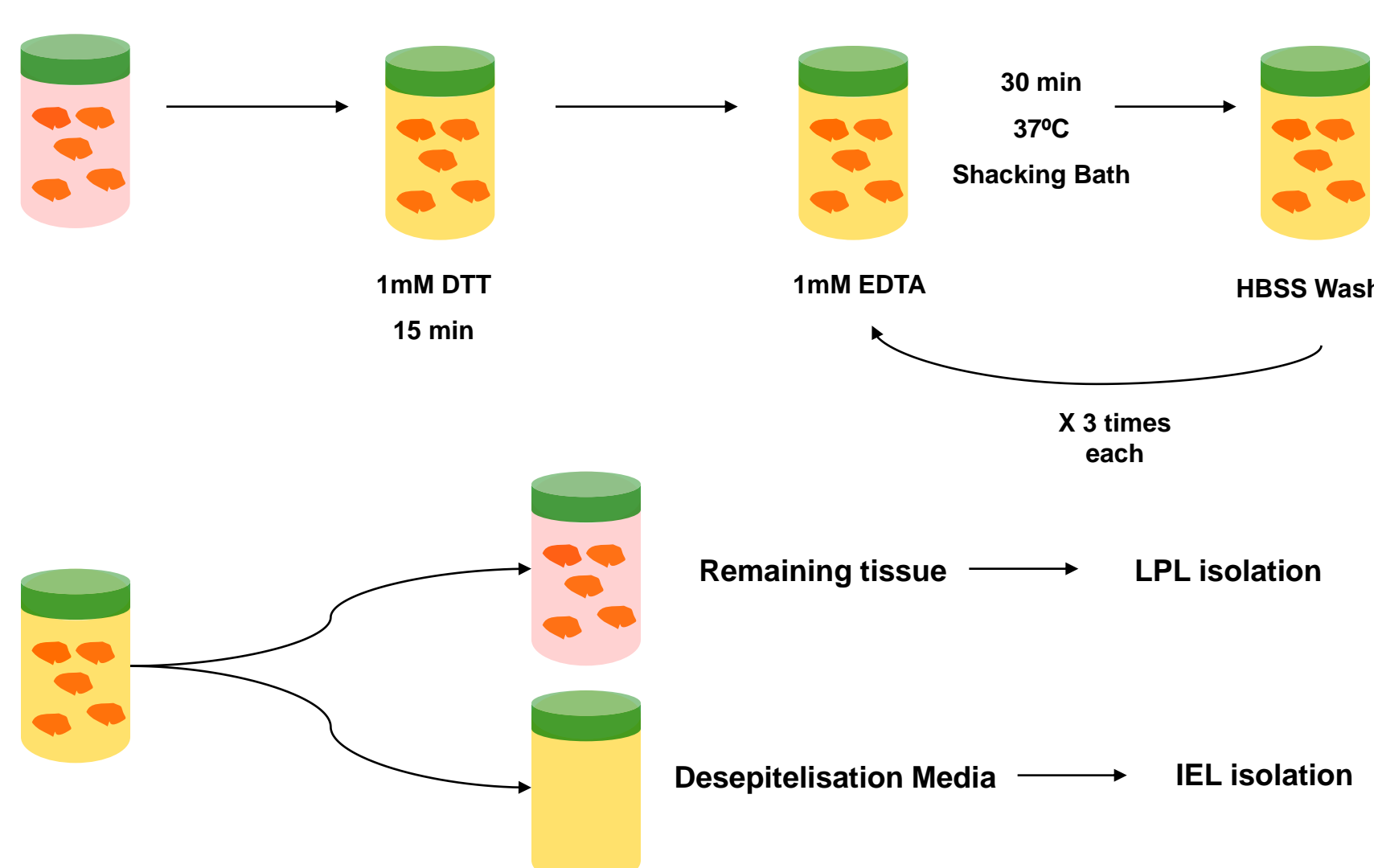
METHODS

DESEPITELISATION METHODS:

PROTOCOL 1: Soft (RT, 25')



PROTOCOL 2: Intense (37°C, 90')



CELLULAR ANALYSIS:

- Yield analysis (n=9)
Absolute Count: Neubauer Chamber
Cell viability: Trypan Blue Exclusion
- Phenotype Analysis (n=6)
Immunohistochemistry (CD3-Dako)
Hematoxylin & Eosine Staining
Flow Cytometry (FACSCalibur+Cell-Quest-BD):
- CD45-Leucocyte
- CD3- T Lymphocytes
- CD4, CD8, CD103 Subpopulations

ESTATISTICAL ANALYSIS:

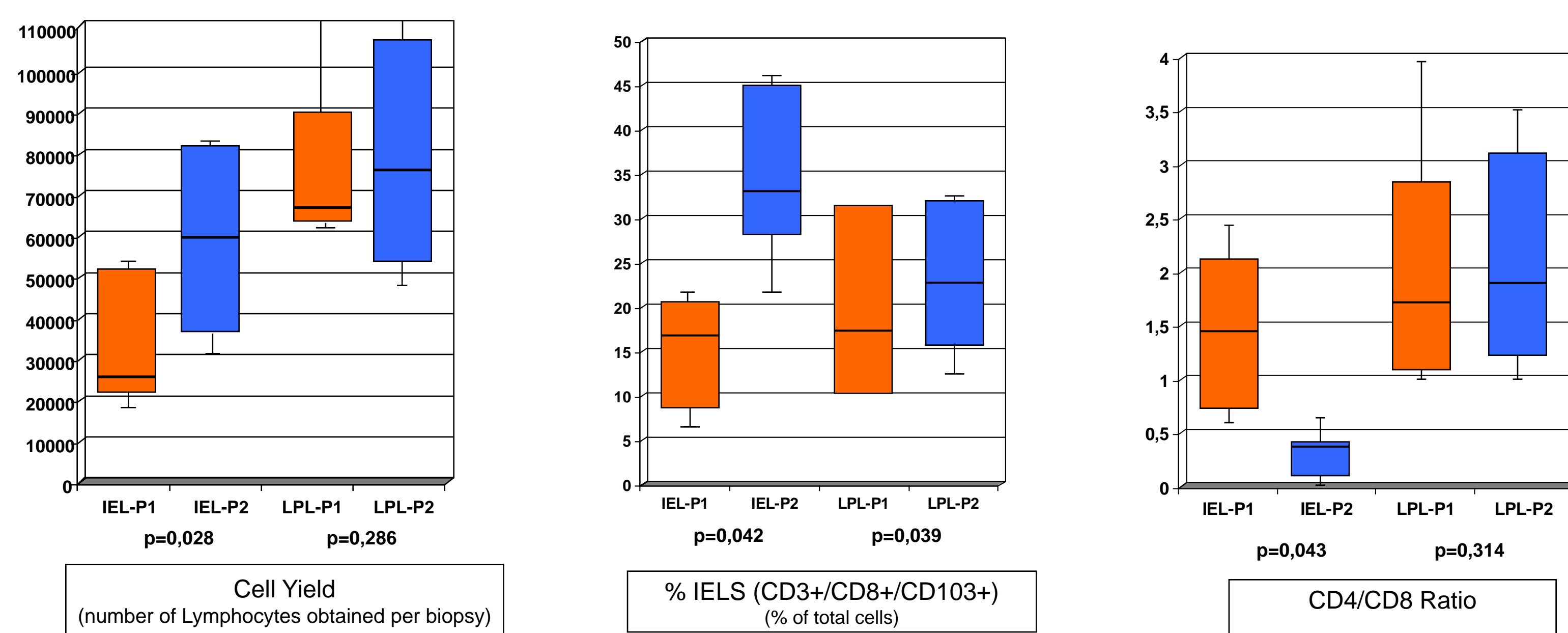
Non parametrical measurements: Median (IntervaleInterQuartile, IIQ)
Non parametrical Tests for paired data: Wilcoxon Test
Significant results if $p < 0,05$

MEASUREMENT OF DESEPITELISATION EFFICIENCY:

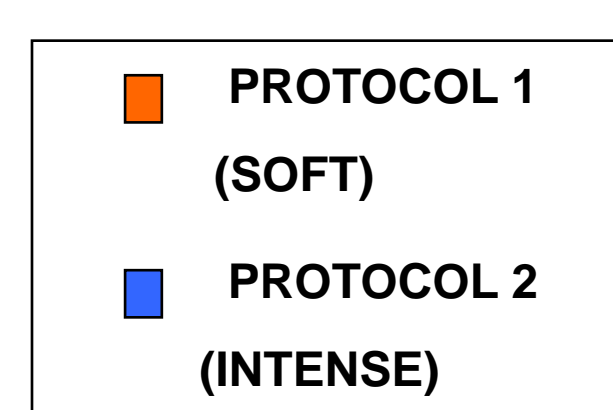
1. Remaining tissue after the treatment (n=5):
- Hematoxylin&Eosin: presence of epithelium
- CD3 Staining: presence of CD3+ positive cells in the mucosal epithelium
2. Obtained Cellular suspension (n=6)
- Presence of "IELs": CD3+, CD8+, CD103+
- CD4/CD8 Ratio

RESULTS

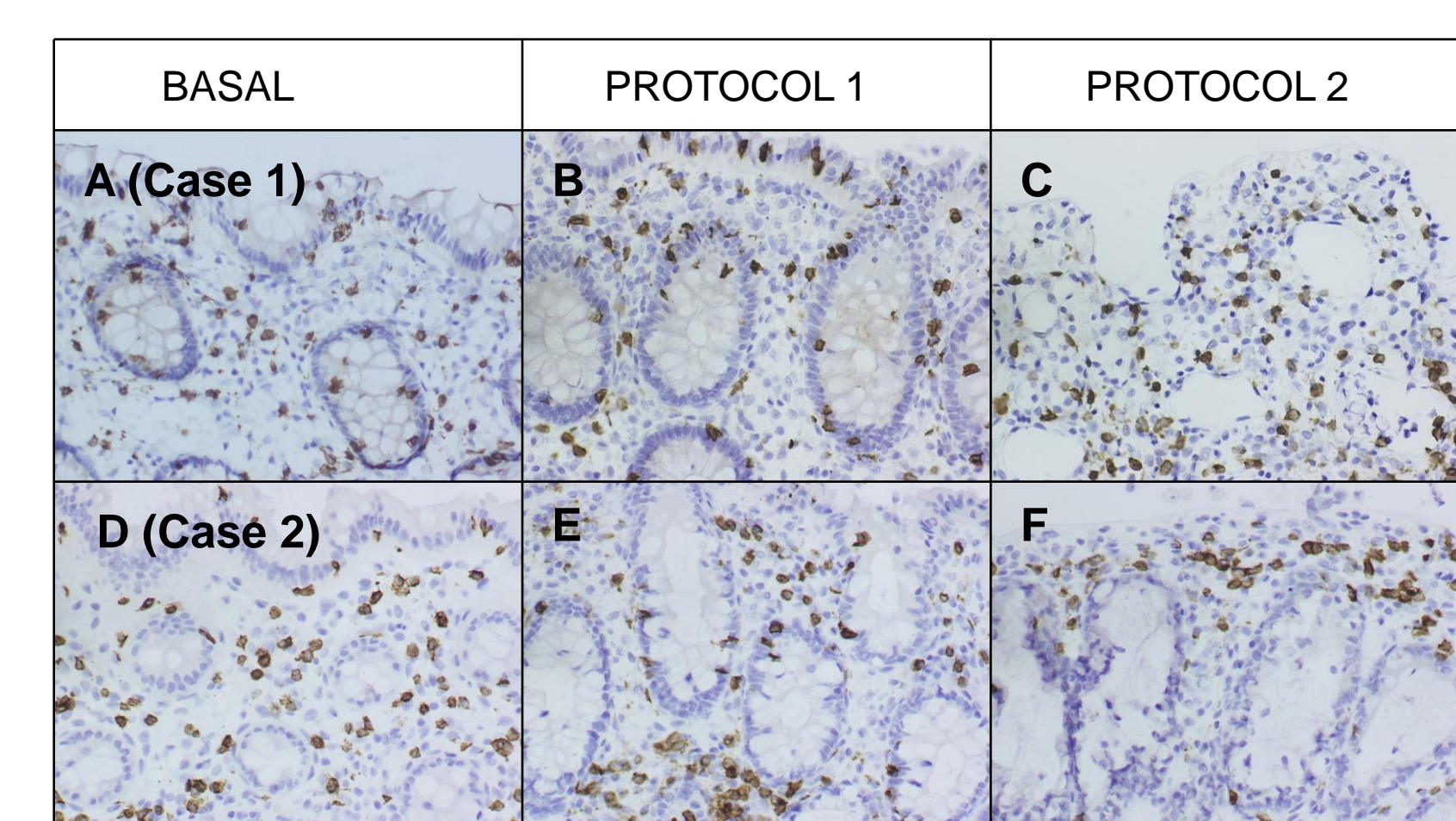
PHENOTYPICAL ANALYSIS by FLOW CYTOMETRY:



- LPL achieved lamina propria criteria (ratio 4/8 > 1,5) by using both methods, but epithelium criteria (ratio 4/8 < 0,5) is only achieved by using the intense protocol 2
- However, lymphocytes with an intraepithelial phenotype (CD3+, CD8+, CD103+) were present in lamina propria fraction, suggesting the presence of remaining epithelium in the LP fraction



SEPARATION EFFICACY: CD3 Immunohistochemistry:



- Desepitelisation effect in the tissue (images of two out of the five analysed cases)
- Protocol 1 did not achieved a proper separation in any case (figs B, E)
- Only in one case Protocol 2 achieved a total separation (fig C)

CONCLUSIONS

- ✓ None of the methods achieved a reliable separation of IEL and LPL populations from colonic specimens
- ✓ CD4/CD8 Ratio is not a good marker of purity of isolated compartments

Similar phenotype and functional capacities of T-lymphocytes in different anatomic locations of human intestine

A. Carrasco; F. Fernandez-Bañares; M. Rosinach; C. Loras; M. Aceituno; J. C. Espinos; M. Forne; J. M. Viver; M. Esteve.
Servei Aparell Digestiu. Fundació Recerca Mutua Terrassa. Hospital Universitari Mútua Terrassa (Spain)

INTRODUCTION

There is scarce information concerning T lymphocyte subpopulations in the normal intestine and their phenotypic and functional differences related to anatomic location. This knowledge is important in studies comparing normal and inflamed intestine in diseases involving different parts of the gastrointestinal tract

AIM

To asses if there are location related differences in T cell subpopulation and apoptosis in healthy intestine

METHODS

PATIENTS:

7 healthy controls 4 men, 48.6 ± 7.4 years

(colonoscopy for colorectal cancer screening)

Biopsies were taken from ileum, right colon and left colon. Normal histology was assessed by immunohistochemistry.

FLOW CYTOMETRY:

- Lymphocytes were isolated by enzymatic overnight digestion.

- Staining was performed for: membrane markers (CD3; CD4; CD8); apoptosis (Annexin-V/7-AAD and Caspase-3); Regulatory T cell (CD25+/FoxP3+); and intracellular cytokine production (IFN-gamma; IL-17-A)

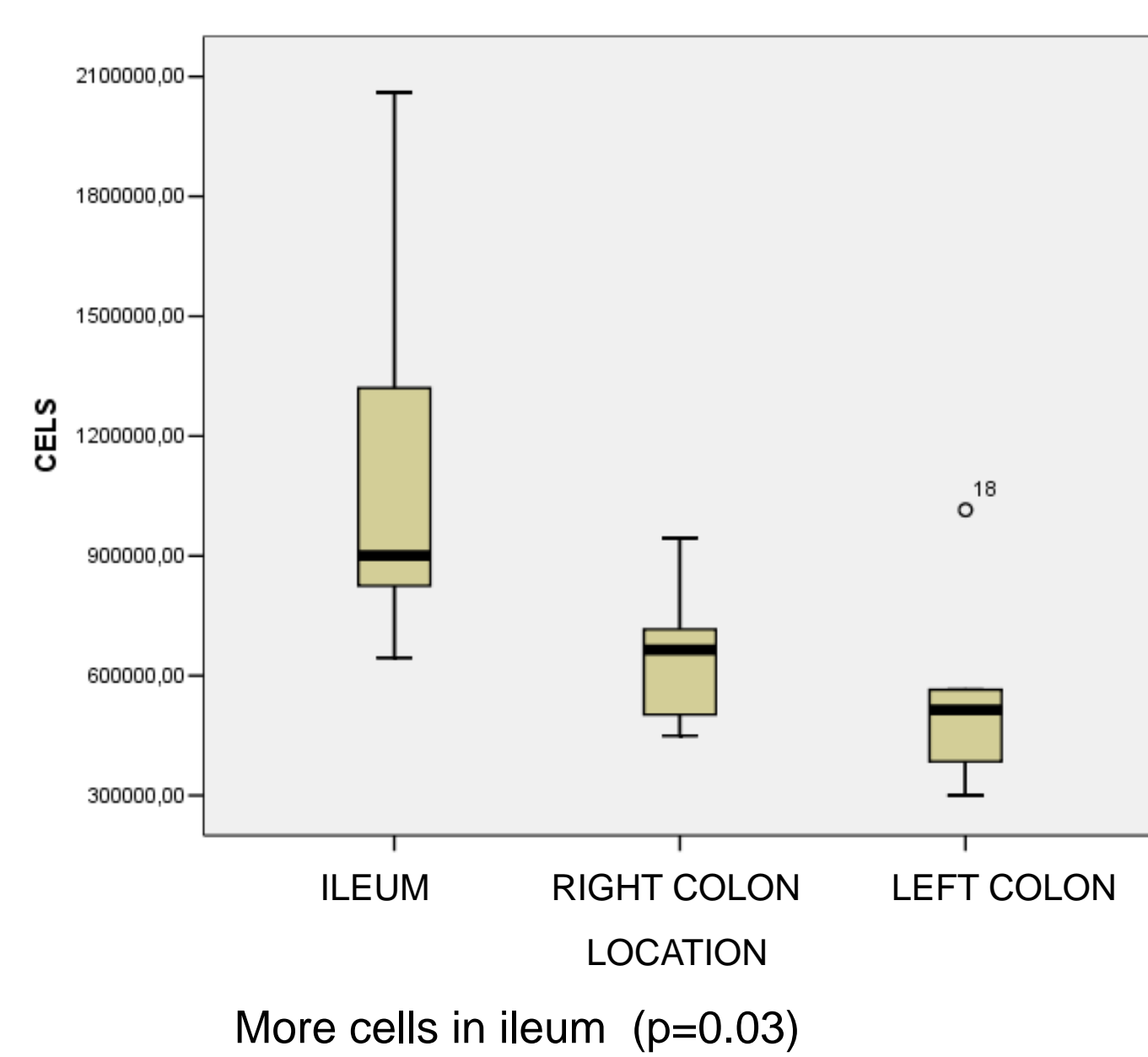
- FACSCalibur and Cell-Quest-PRO (Becton Dickinson)

STATISTICAL ANALYSIS:

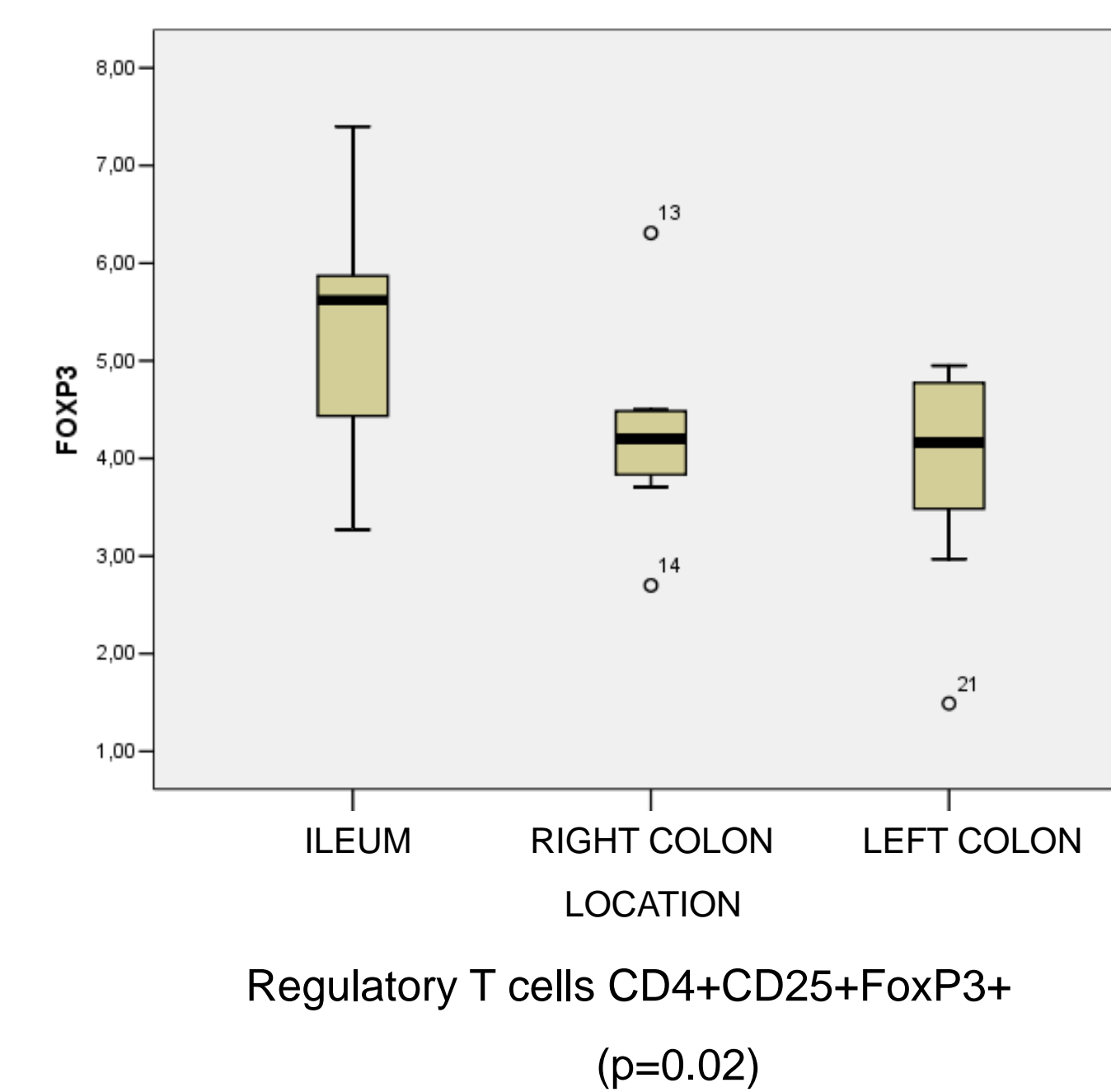
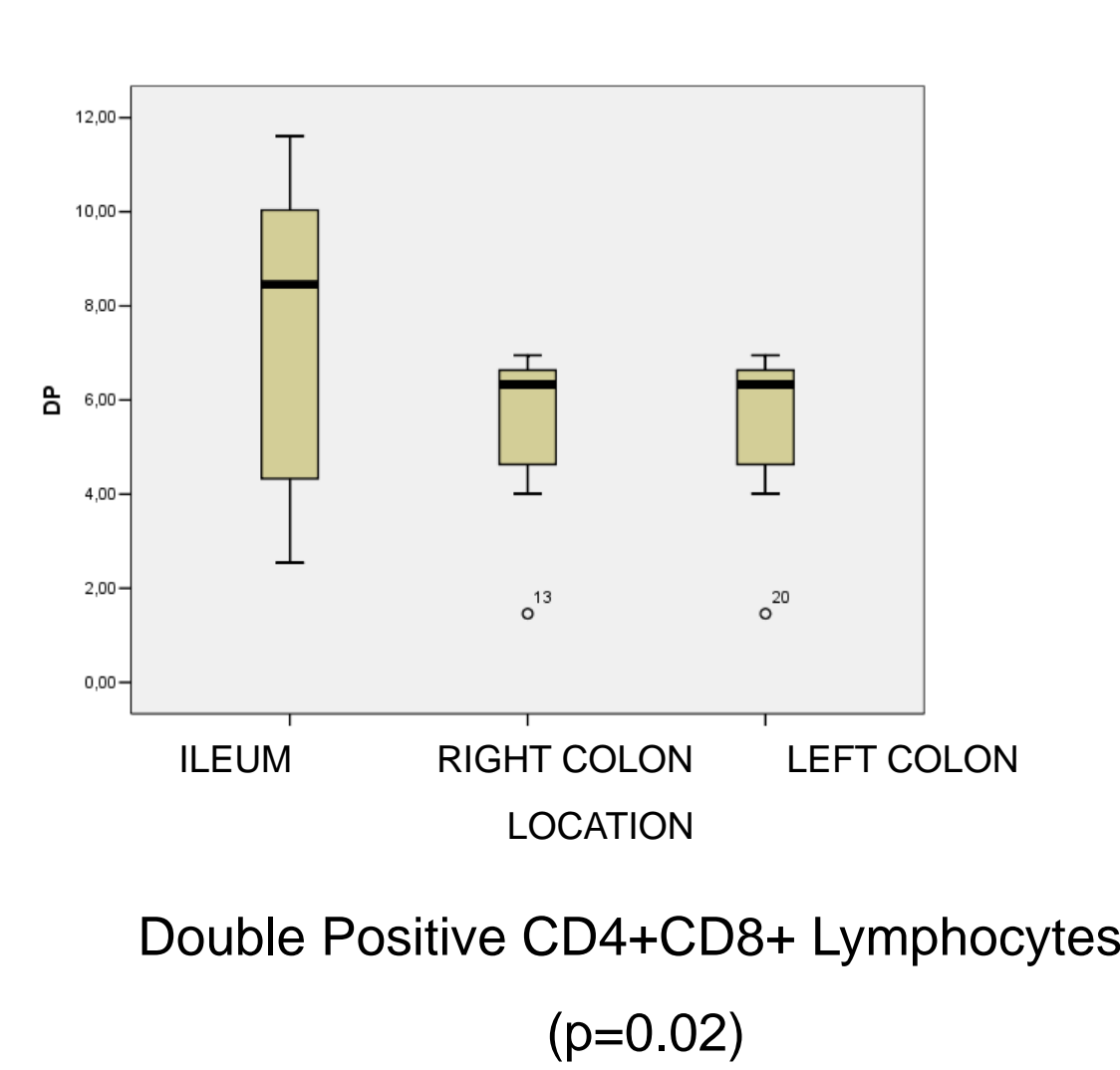
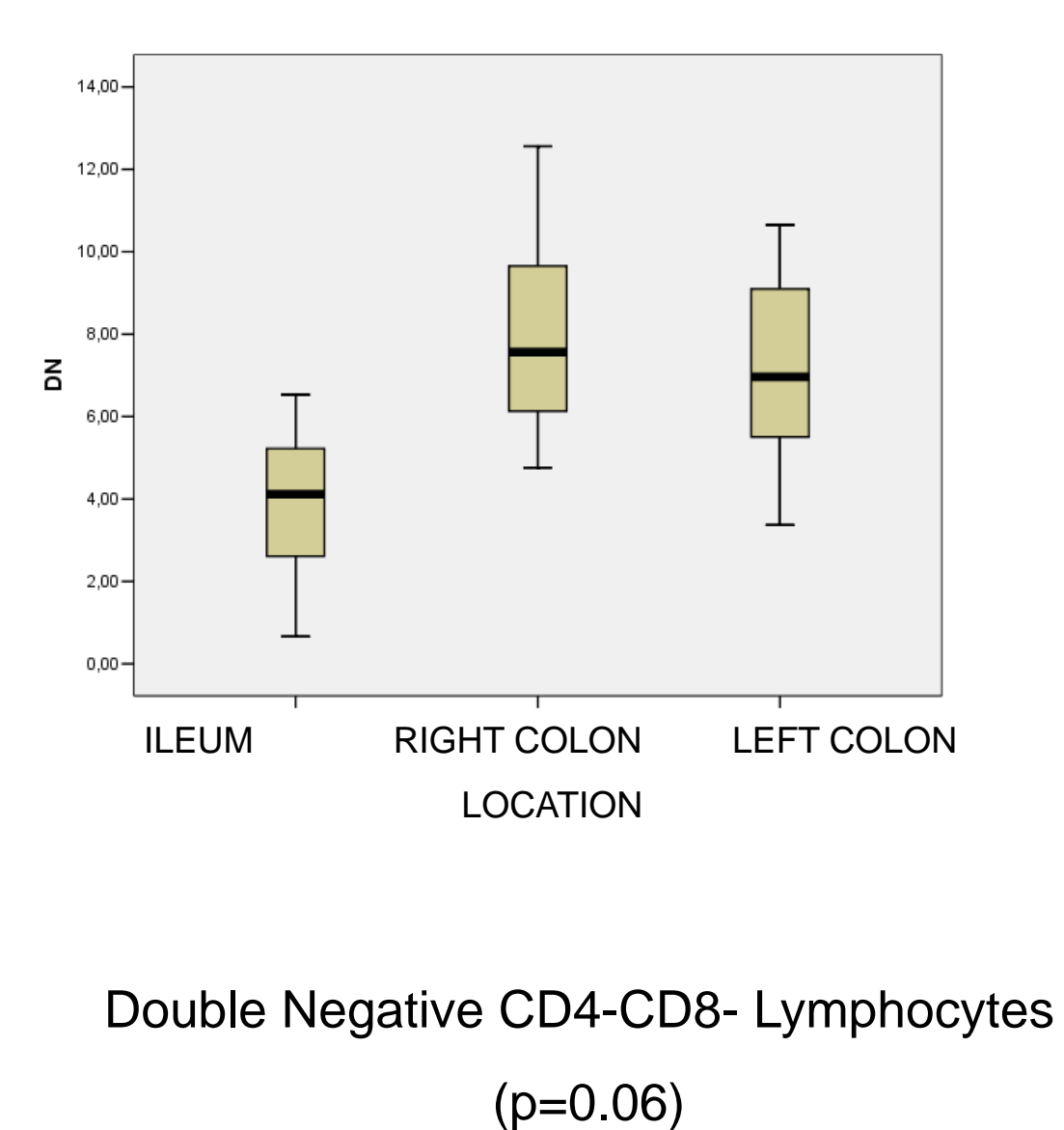
- Test for paired data (SPSS)

RESULTS

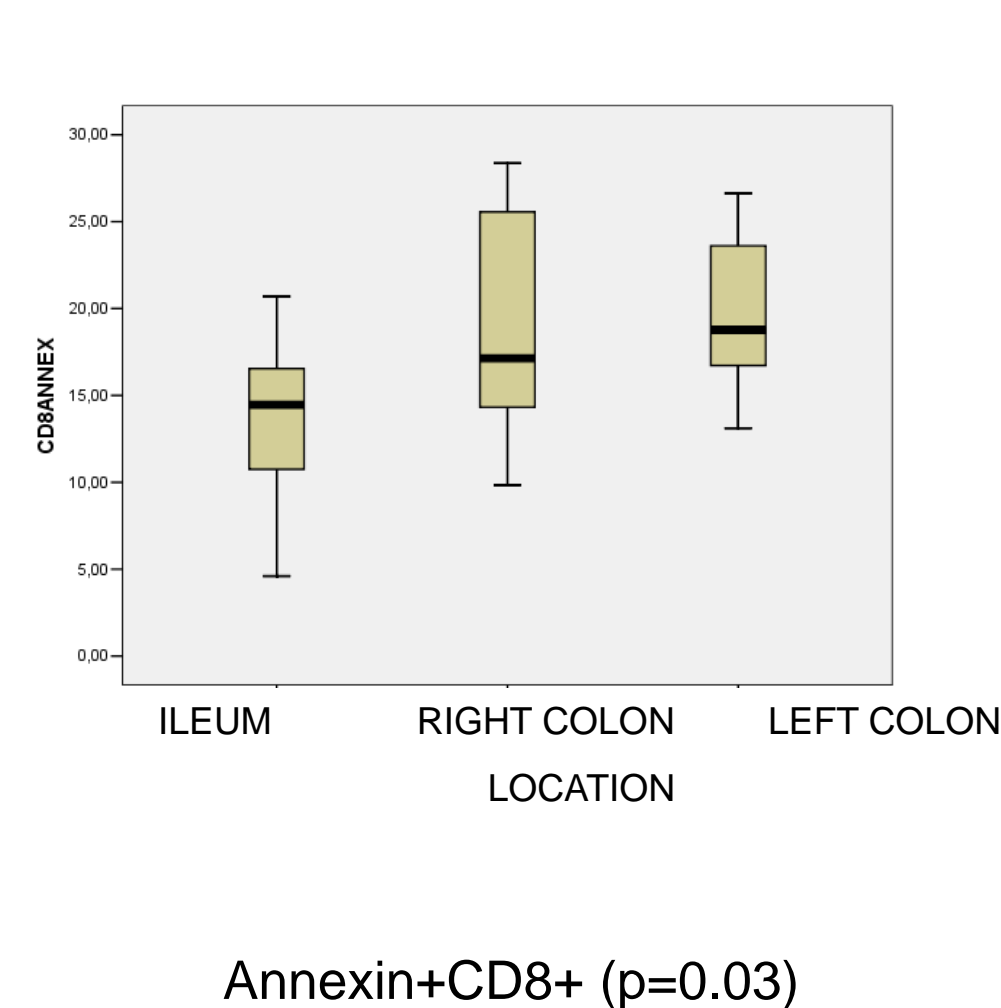
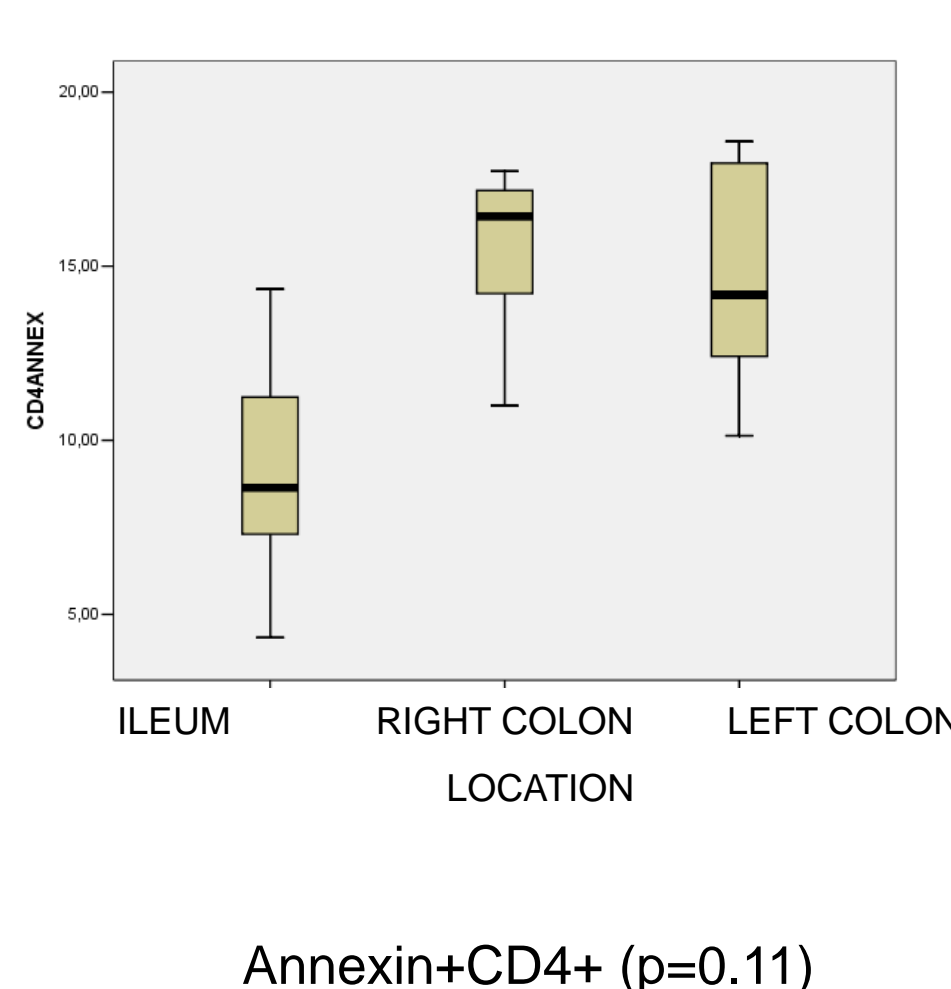
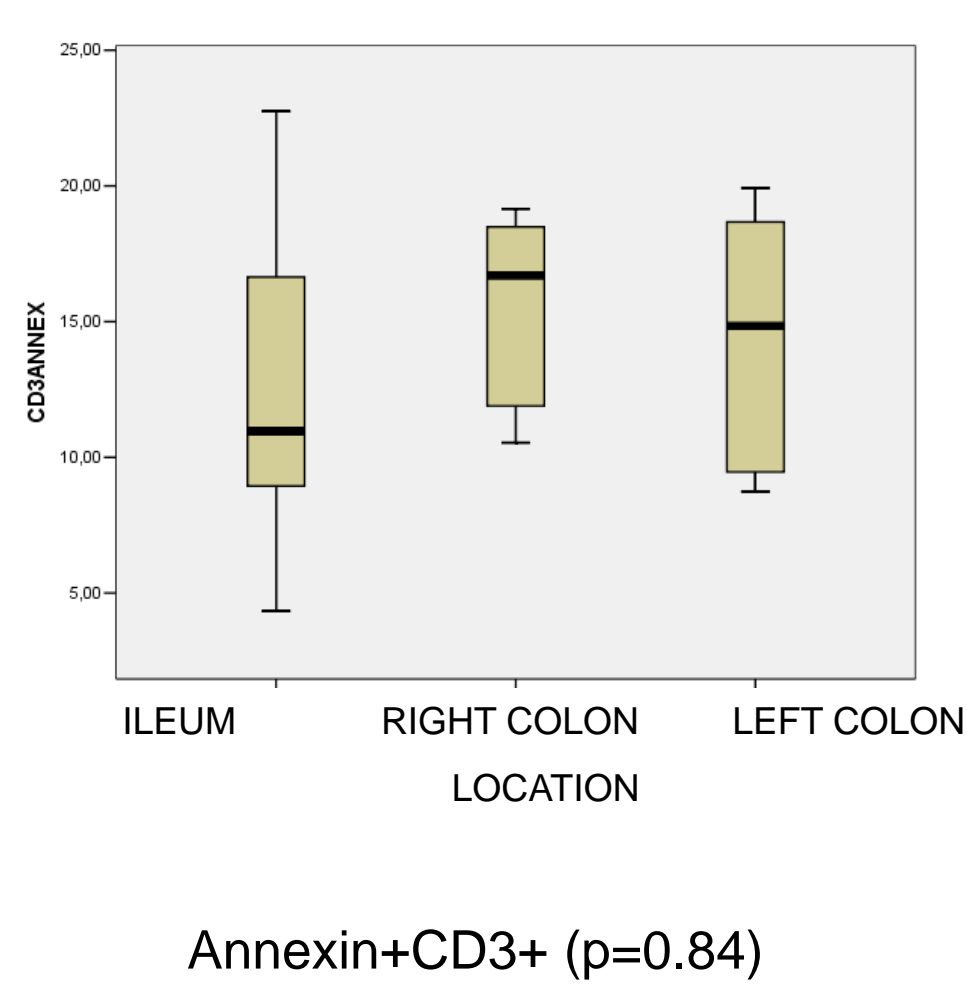
Number of isolated cells:



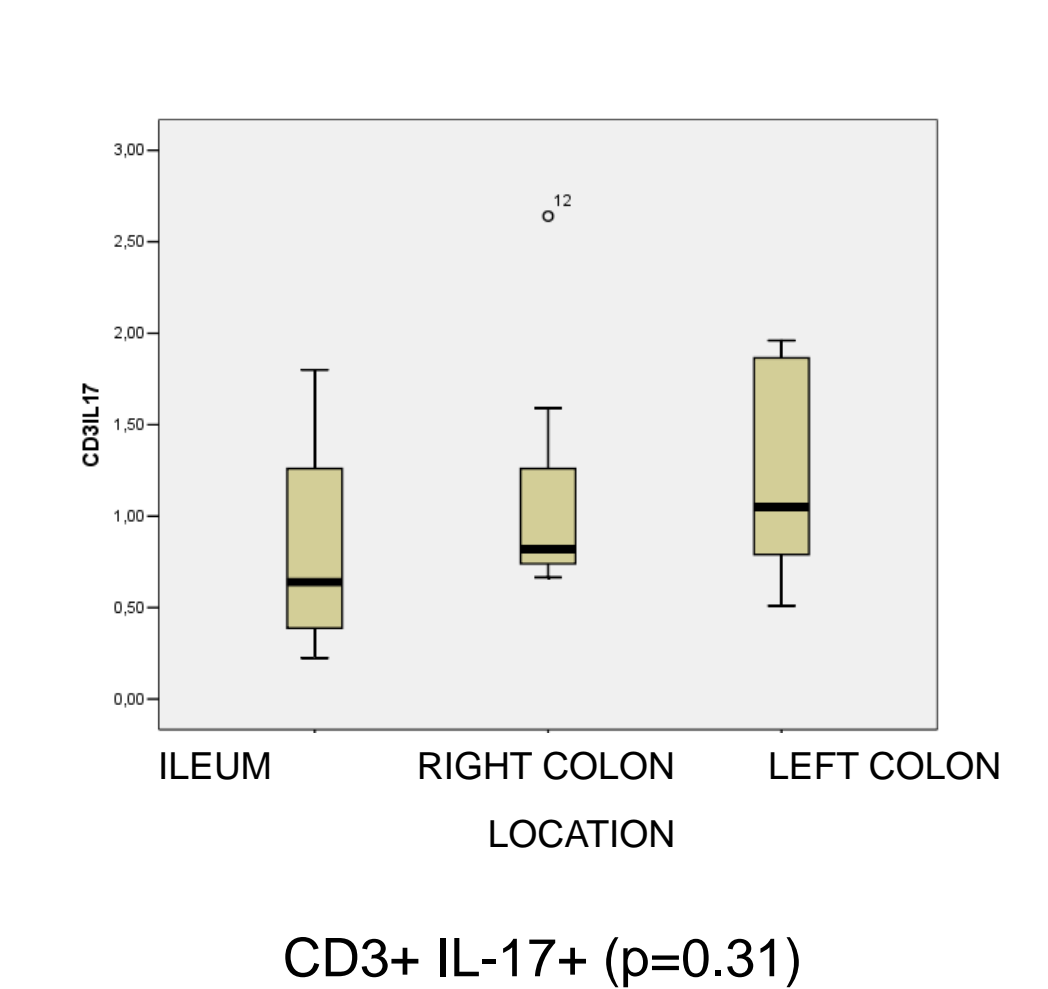
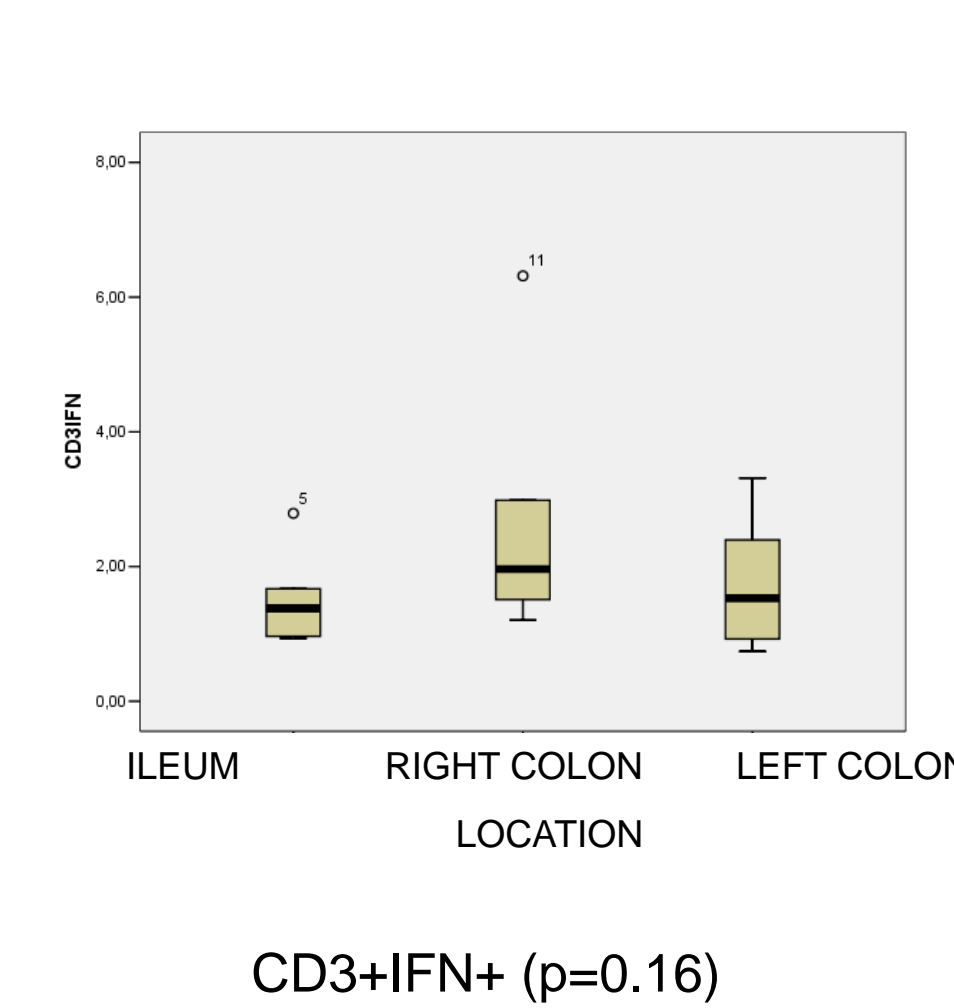
Phenotypes:



Apoptosis rate:



Intracellular cytokine production:



CONCLUSION

- ✓ No differences were found between right and left colon in the lymphocyte phenotypes and apoptosis rate.
- ✓ A decreased apoptosis rate was found in ileum compared to colon. Concerning to the cellular phenotype an increase of Double Positive Cells and a decrease of Double Negative Cells were found in ileum compared to colon. Since these subpopulations have important regulatory functions in immune response and maintenance of immune homeostasis, these differences should be taken into account in studies of intestinal inflammation.

Regulatory CD25+FoxP3+ T cells in the intestinal mucosa of patients with Inflammatory Bowel Disease. Corticoids treatment effect.

A. Carrasco (1); F. Fernandez-Bañares (1); M. Rosinach (1); C. Loras (1); M. Aceituno (1); E. Pedrosa (2); J. Mañé (2); V. Loren (2); J.M. Viver (1); M. Esteve (1).

(1) Servei Aparell Digestiu. Fundació Recerca Mútua Terrassa. Hospital Universitari Mútua Terrassa

(2) Unitat de recerca en Gastroenterologia i Nutrició. Institut de Recerca en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol

INTRODUCTION

A decrease of regulatory CD3+CD4+CD25+FoxP3+ T cells (Treg) in peripheral blood has been detected in patients with Inflammatory Bowel Disease (IBD), and an increase of these same cells is associated to a good response to rescue treatments (infliximab or leukocytapheresis) in steroid refractory patients.

In intestinal mucosa, this subpopulation has been assessed only by PCR and immunohistochemical methods, and there is not any information by using flow cytometry.

AIM

To analyze Treg subpopulation in peripheral blood and intestinal mucosa in IBD patients and to analyse the effect of corticosteroid treatment upon this lymphocyte subpopulation.

METHODS

PATIENTS:

- 7 healthy controls,
- 4 ulcerative colitis (UC)
- 4 infectious colitis (IC)
- 20 Crohn Disease (CD): basal sample (Active CD) and 3-5 weeks after steroid treatment

FLOW CYTOMETRY:

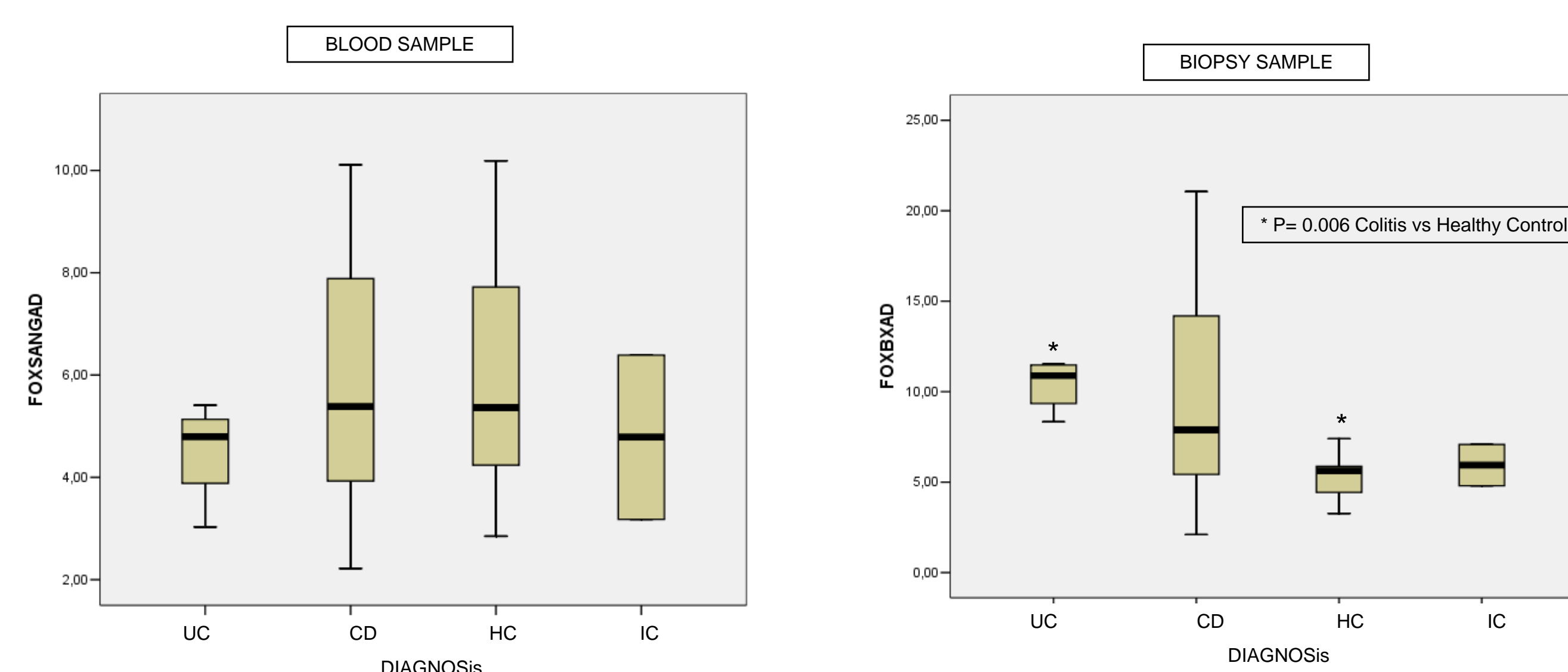
- Isolation of lymphocytes:
 - Fycoll (Peripheral Blood)
 - Overnight enzymatic isolation (biopsy specimen)
- Intracellular Staining Kit (e-Bioscience)
- Adquisition and analysis: FACSCalibur and Cell-Quest-PRO (Becton Dickinson)

STATISTICAL ANALYSIS:

- Analysis for paired and unpaired data
- SPSS for Windows. Significance $p \leq 0.05$

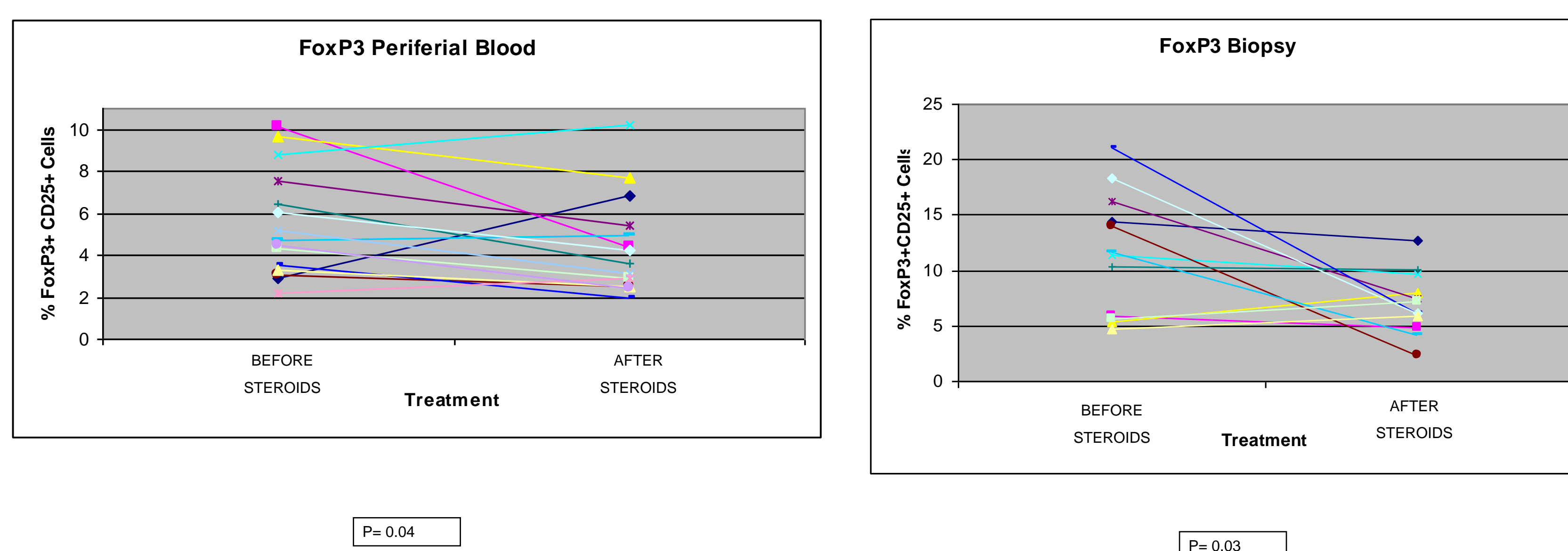
RESULTS

CD25+FoxP3+ expression in basal sample:



Changes of CD25+FoxP3+ cells before and after steroids treatment in Crohn Disease:

A significant reduction in CD25+FoxP3+ cells after steroid treatment is detected both in peripheral blood and in intestinal biopsy. This decrease occurs independently of the steroid response (sensitive, dependant or refractory) to treatment.



Changes in FoxP3 expression in Crohn Disease						
Steroid Response	BLOOD BEFORE STEROIDS	BLOOD AFTER STEROIDS	P	MUCOSAL BIOPSY BEFORE STEROIDS	MUCOSAL BIOPSY AFTER STEROIDS	P
SENSITIVE	6.08 (3.29-8.82)	3.57 (2.54-10.25)	0.273 n=4	8.75 (5.38-21.06)	5.95 (4.21-8.02)	0.225 n=4
DEPENDANT	5.18 (2.88-9.67)	4.97 (1.94-7.67)	0.715 n=4	13.13 (2.1-18.31)	4.28 (2.36-6.21)	0.180 n=2
REFRACTORY	5.46 (2.22-10.11)	3.62 (2.47-4.47)	0.465 n=4	10.01 (4.71-16.23)	7.32 (5.95-12.69)	0.144 n=4

CONCLUSIONS

- ✓ Contrary to previously reported data, a decrease of Treg cells in CD as compared to controls has not been detected either in blood or in intestinal mucosa of CD. These differences with other studies might be due to the type of population included (early CD in the present study versus late CD in others).
- ✓ Treatment with corticosteroids causes a decrease of Treg cells in blood as well as in intestinal mucosa being different from that caused by rescue treatments (Infliximab and leukocytapheresis).

Interleukin 10 expression and distribution pattern in healthy and inflamed bowel.

Relationship with steroid response in Crohn's Disease

Carrasco A., Fernandez-Bañares F, Loras C, Pedrosa E, Aceituno M, Rosinach M, Temiño R, Forné M, Sainz E, Andujar X, Esteve M.
Gastroenterology Department. Hospital Universitari Mútua Terrassa. Fundació per a la Recerca Mútua Terrassa (Catalonia, Spain). CIBERehd.

INTRODUCTION

Interleukin-10 (IL-10) is expressed by many cell types of the innate and adaptive immune system. Its effect depends on the cell type where it is produced and the time and location of release. IL-10 distribution in the intestine is not well known due to the methodological difficulty of cytokine staining in human biopsies.

AIM

- To evaluate the distribution and intensity of IL-10 production:
 - in healthy and inflamed intestine and
 - in Crohn's disease (CD) in relation with corticosteroid response

METHODS:

Patients:

- 10 healthy controls: paired biopsies from ileum, right and left colon
- 26 patients with intestinal inflammation, biopsies from inflamed areas:
 - 16 Crohn's disease (CD), they were classified according to corticosteroid response
 - 6 steroid-responsive, 5 steroid-dependent, 5 steroid-refractory
 - 6 ulcerative colitis (UC)
 - 4 infectious colitis (IC)

Immunofluorescence staining: IL10 primary antibody was used at a 1:50 concentration with Alexa conjugated secondary Antibody (green). Nuclei were stained with Hoestch (blue)

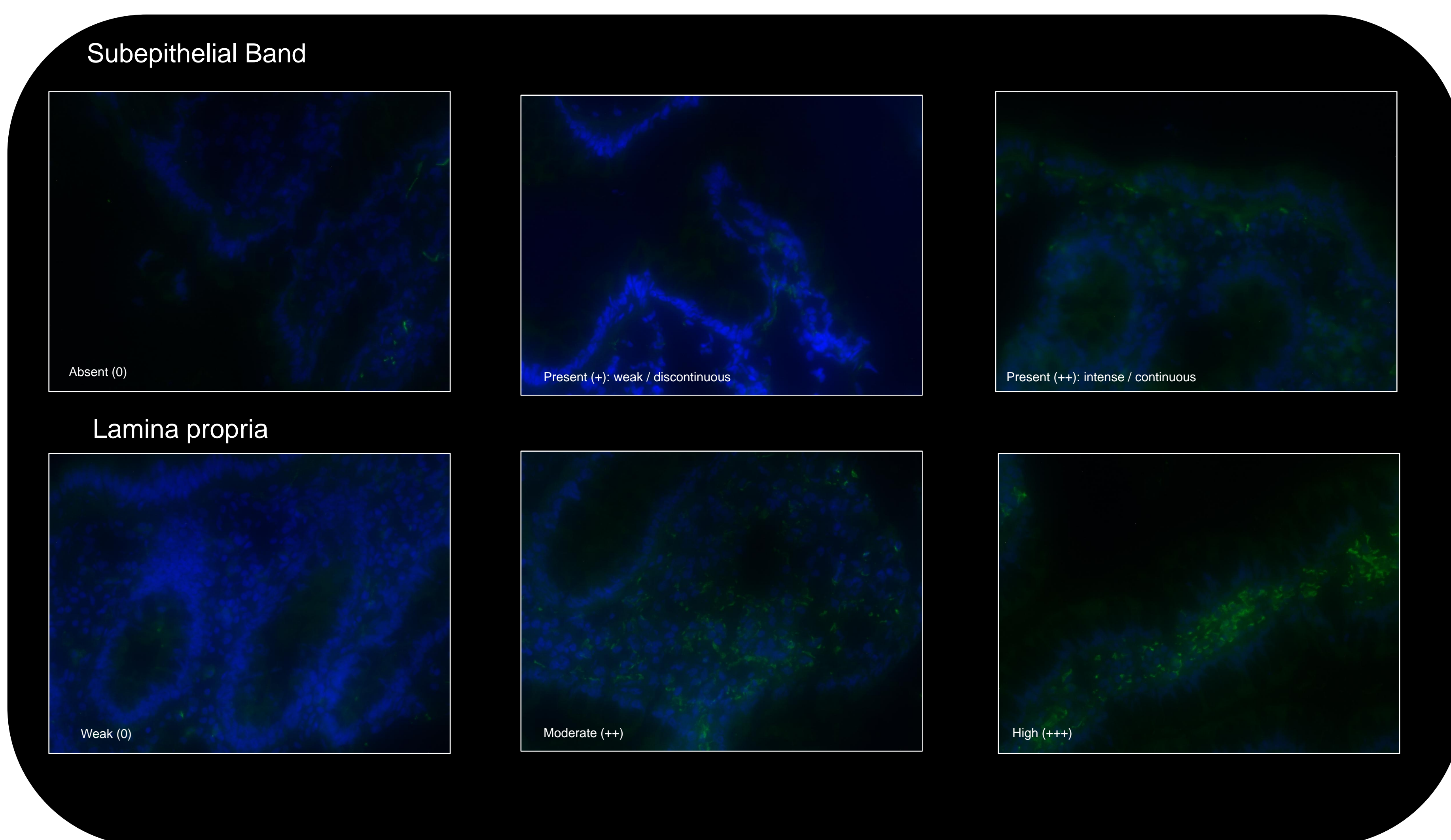
Quantitative image analysis: ImageJ software was used to calculate Median Fluorescence Intensity (FI) and % of area covered by IL10 staining over the total biopsy surface (A)

Semi quantitative analysis: Lamina propria infiltrate and subepithelial localisation were analysed according to a previously established semi quantitative score

Statistics: Non-parametric tests were used (Mann Whitney, Kruskal-Wallis) with SPSS software. Results were considered significant if $p < 0.05$.

RESULTS

Semiquantitative Score:



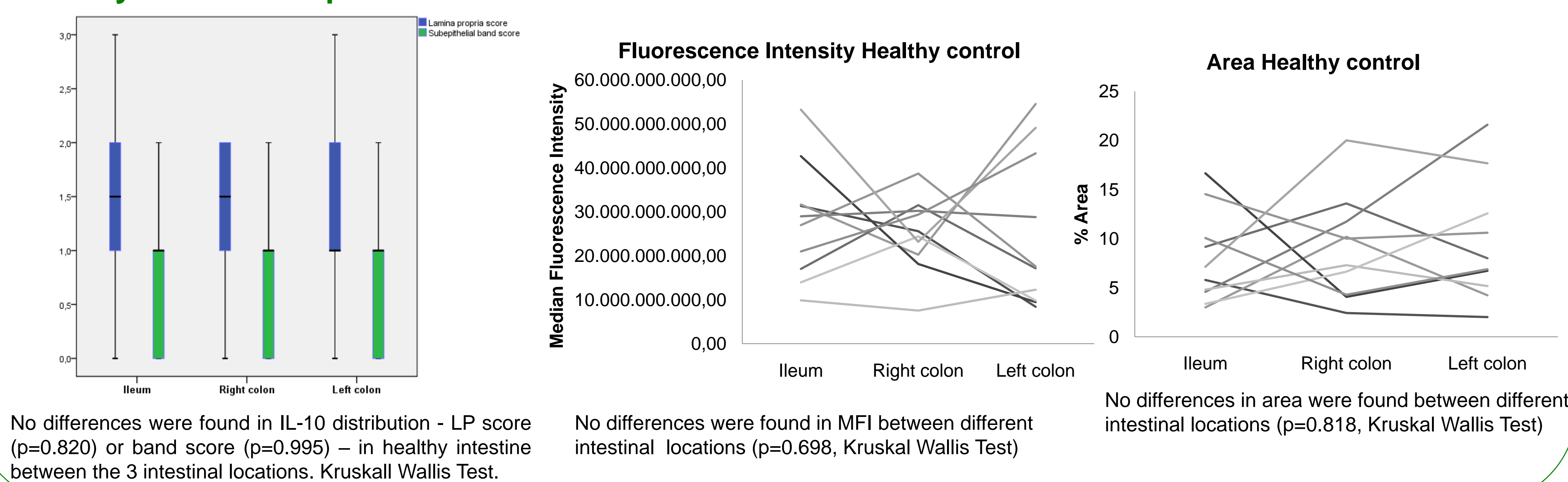
Staining Validation:

- Negative control: primary antibody was omitted
- Autofluorescence background: all antibodies were omitted

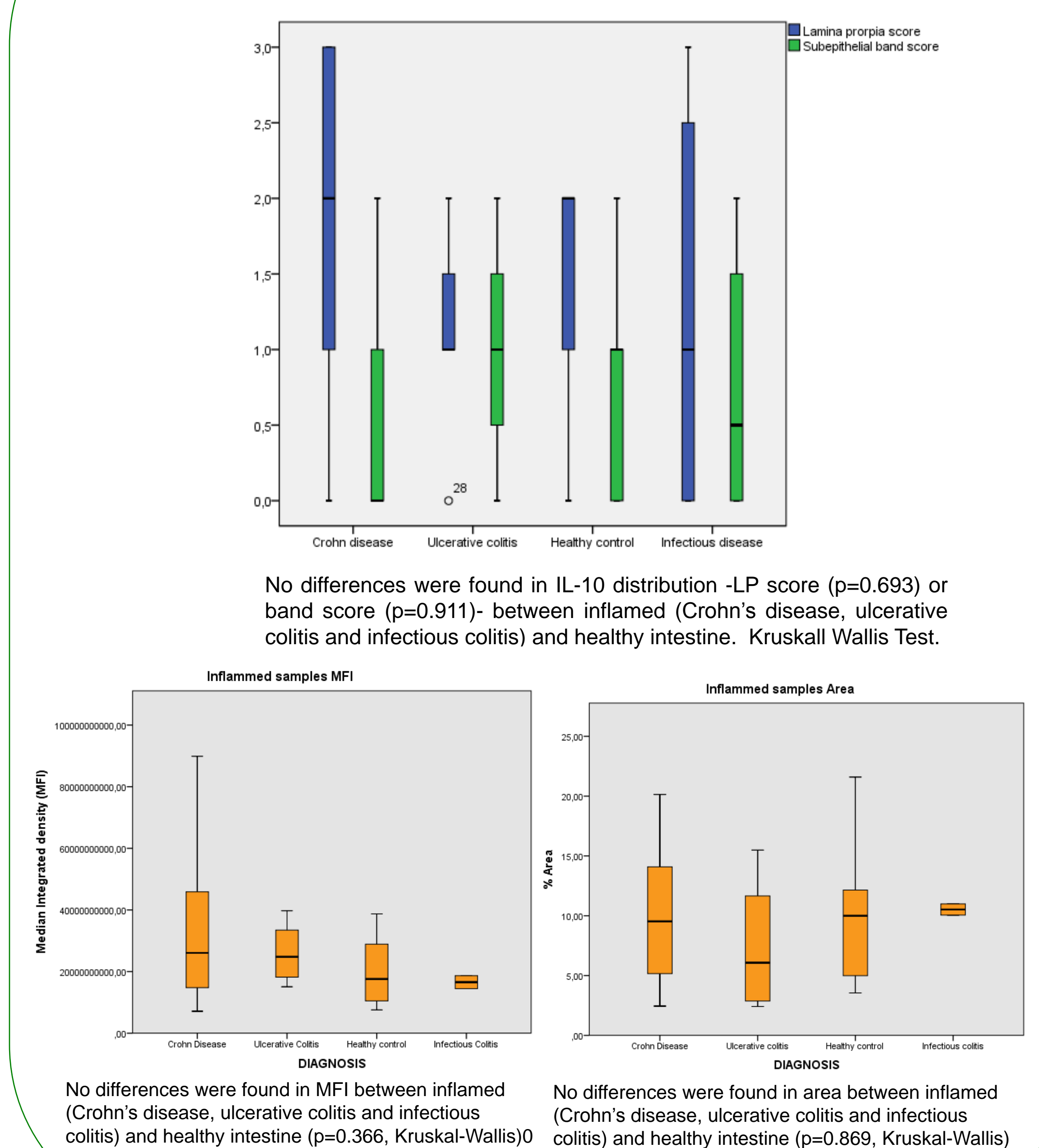
Quantitative analysis validation:

- Negative control have very low values
 - Area: 0,04
 - MFI: 90.041.296
- Positive control have very high values:
 - Area: 15,15 ± 5,31
 - MFI: 33.359.500.234 ± 5.145.080.324
- The reproducibility of the technique was confirmed by measuring repeatedly every day (10 days) the same positive control sample.

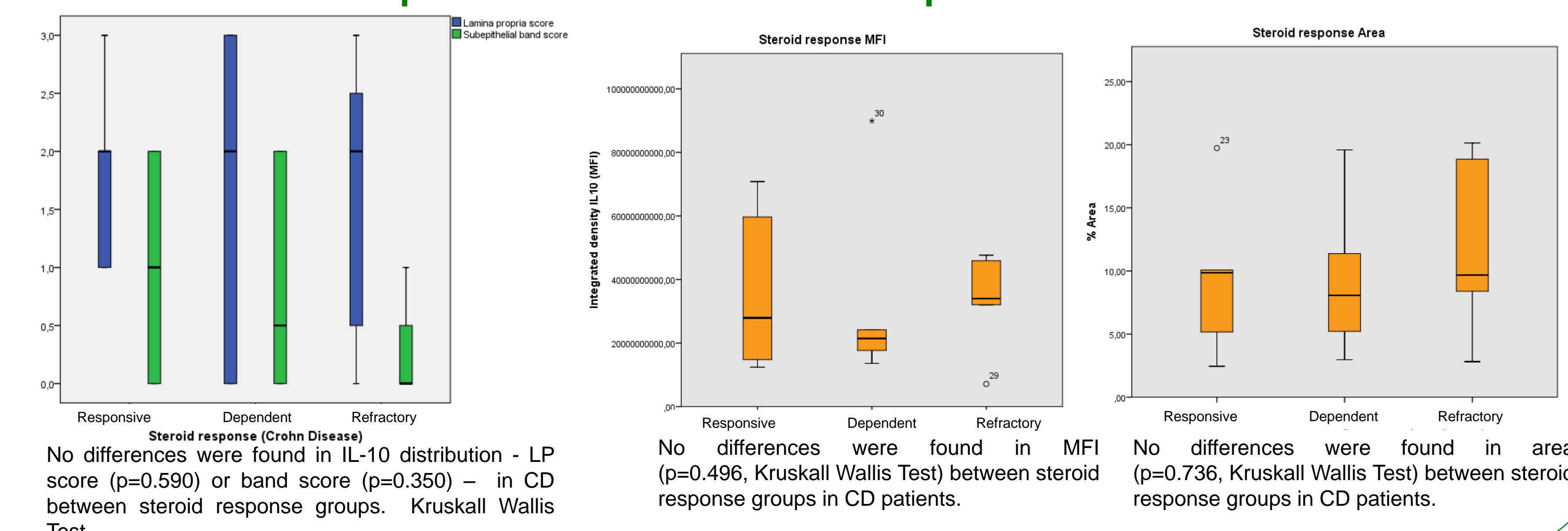
Healthy control samples: relation with location



Inflamed samples: relation with diagnosis



Crohn's Disease samples: relation with steroid response



CONCLUSIONS

✓ The good IL-10 staining achieved by immunofluorescence reveals that this anti-inflammatory cytokine is always present in along the intestine and regardless of health or disease status.

✓ The IL-10 disposition as a subepithelial band suggests an important role in the defense against luminal antigens.

Lymphocytic and collagenous colitis: two clinically similar entities but with a distinct immunological pattern

A Carrasco¹, M Esteve¹, E Pedrosa¹, M Rosinach¹, M Aceituno¹, X Andújar¹, C Loras¹, Y Zabana¹, M Forné¹, A Salas², F Fernández-Bañares¹.

¹. Gastroenterology Department. Hospital Universitari Mútua Terrassa. Fundació per a la Recerca Mútua Terrassa (Catalonia, Spain). CIBERehd.

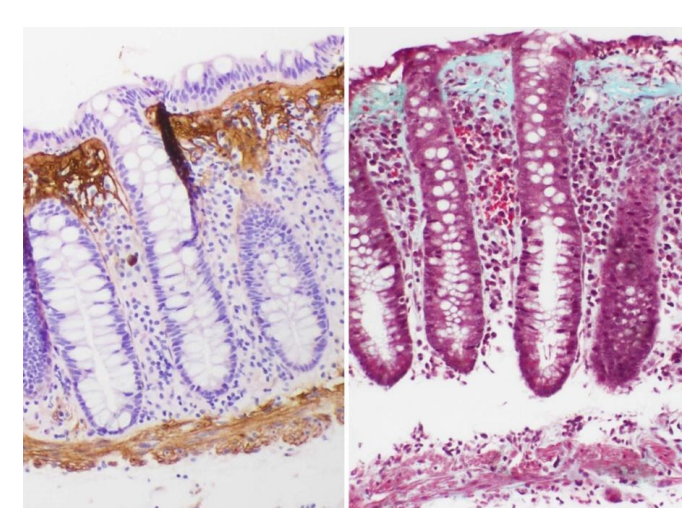
². Pathology Department. Hospital Universitari Mútua Terrassa. Fundació per a la Recerca Mútua Terrassa (Catalonia, Spain). CIBERehd.

INTRODUCTION

The pathophysiology of microscopic colitis (MC) is poorly understood and it is unknown whether the two forms of presentation, collagenous colitis (CC) and lymphocytic colitis (LC) share common immunological mechanisms.

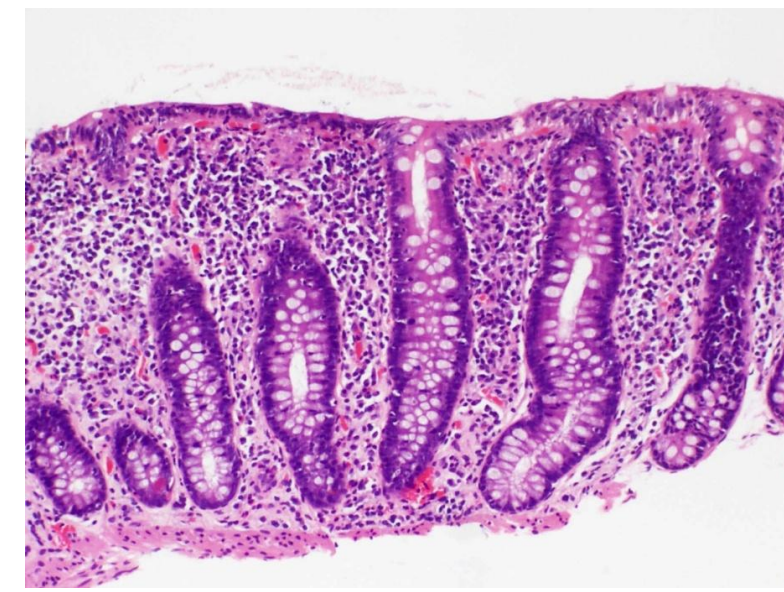
PATIENTS

- 15 Collagenous Colitis (CC) patients (14 women, 53±12 years)
 - 8 Lymphocytic Colitis (LC) patients (4 women, 65±11 years)
- CC and LC patients had diarrhea at inclusion and were not receiving any medication.
- 10 Healthy Control (HC) individuals with normal colonoscopy and colon histology (4 women, 50±8 years)



←CC: Subepithelial collagenous band (>10µm)

LC: Increased IEL (>20 IEL / 100 EC) →



AIM

To evaluate differences between CC and LC in mucosal immune response and cytokine expression.

METHODS:

Cell isolation: Lymphocytes were obtained from 10 biopsies with an overnight incubation with low dose enzymes as previously described (Carrasco et al. JIM 2012)

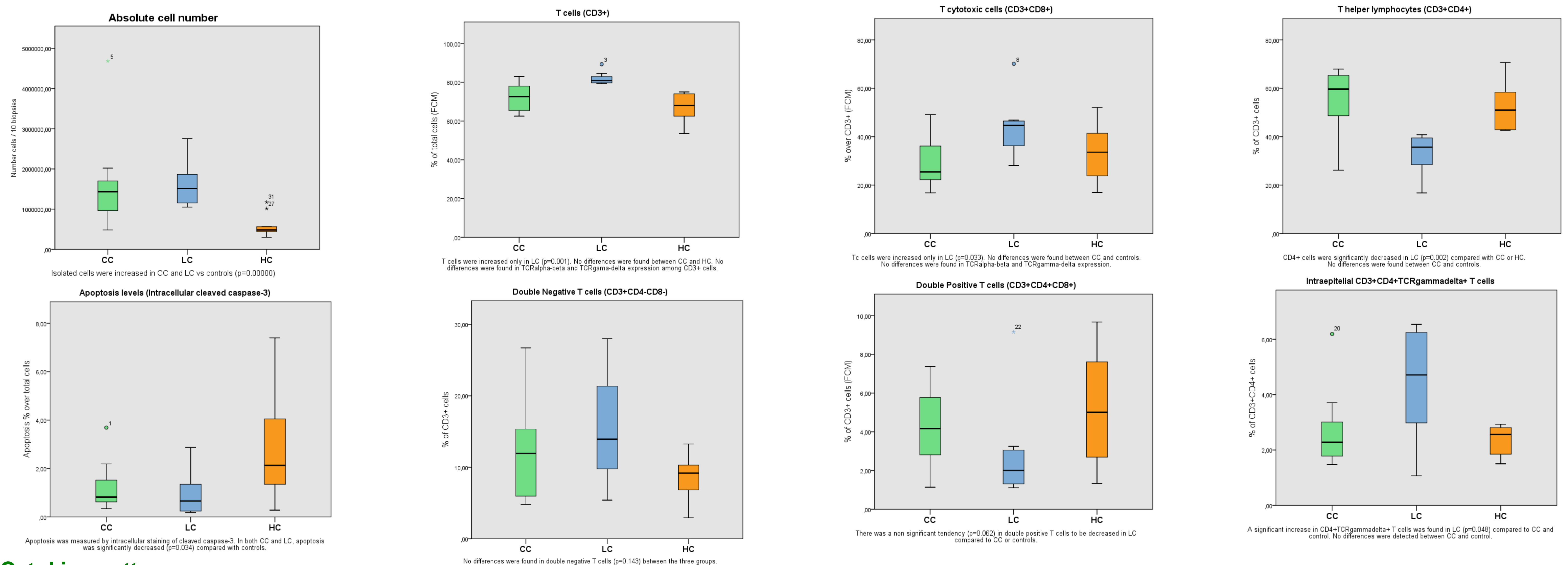
Flow cytometry: Lymphocyte subsets and apoptosis were measured by four-color flow cytometry (FACSCalibur, BD)

Quantitative real time PCR (RT-PCR): Cytokine expression was analysed by RT-PCR. Results are expressed as “fold increase” versus control group, and are calculated with the 2^{-ΔΔCt} method with HPRT as a housekeeping gene. HPRT was selected out of a batch of 6 housekeeping genes according to Genorm, Normfinder and BestKeeper softwares.

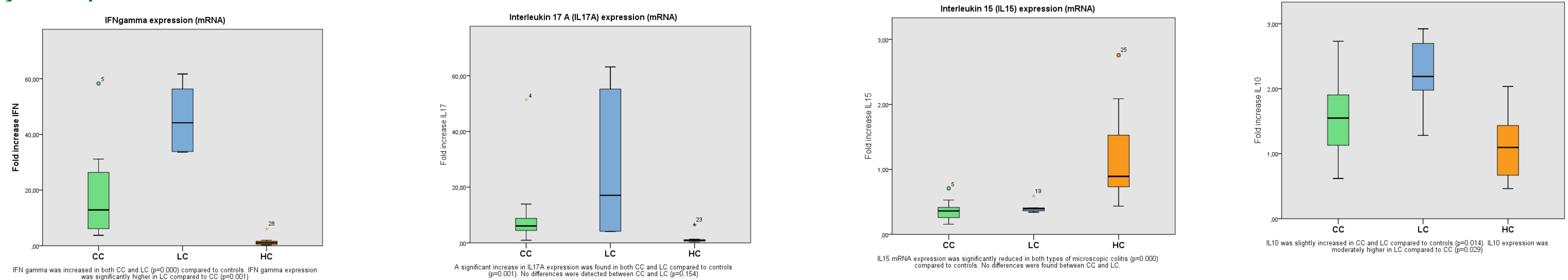
Statistics: Non-parametric tests were used (Mann Whitney, Kruskal-Wallis) with SPSS software. Results were considered significant if p<0.05.

RESULTS

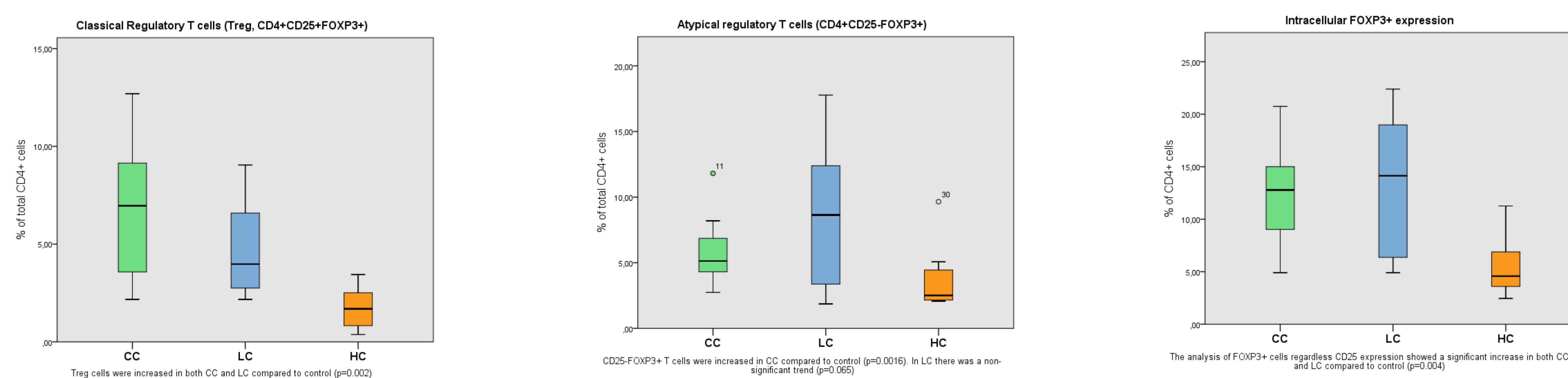
Lymphocyte subpopulations:



Cytokine pattern:



Regulatory T cells (Treg):



Summary:
CC and LC are similar: Both present an increase in Treg and a reduction in apoptosis levels
CC and LC are different: Alterations in CD8+, CD4+, CD4+TCRγδ+ are present only in LC. Cytokine expression of IFN, IL10 is higher in LC compared to CC.

CONCLUSIONS

- ✓ Reduced apoptosis in LC and CC may play a role in the accumulation of inflammatory cells in the mucosa.
- ✓ We detected remarkable differences in the immunological pattern between CC and LC, suggesting that they do not share the same pathophysiological mechanisms.

Th1 and Th17 response in relation with steroid response in Crohn's disease

A Carrasco, F Fernández-Bañares, Y Zabana, M Aceituno, M Rosinach, X Andújar, R Temiño, C Loras, M Esteve

Hospital Universitari Mutua de Terrassa, CIBERehd, Terrassa, Barcelona, Spain.

INTRODUCTION

Th1 and Th17 cells are increased in mucosa in inflammatory bowel disease (IBD) patients. In Crohn's Disease (CD) peripheral Th17 cells are increased in late patients compared with newly diagnosed (Veny et al 2010). Increased Th17 cells are also increased in anastomosis in post-surgical recurrent patients (Zorzi et al 2013). Therefore, Th17 cells increase seems to be related with the perpetuation of inflammation and the lack of response of medical treatments, and could be useful for steroid response prediction.

AIM: Assess usefulness of Th1 and Th17 cells as steroid response predictors

METHODS

PATIENTS:

- Crohn's Disease Crohn (n=30):

- 23 active patients. Inclusion before steroid intake. Classified according to steroid response: 5 steroid sensitive, 6 steroid dependent and 5 steroid resistant.

- 7 multiresistant patients: inclusion at the time of surgery for intestinal resection.

- Ulcerative colitis (n=7): as IBD-inflammatory control

- Colitis infecciosa (n=5): as non-IBD inflammatory control

- Healthy control (n=10): as non-inflamed control.

LYMPHOCYTE ISOLATION:

- from peripheral blood: Fycoll-Hypaque

- from mucosal biopsies: Smooth desepitalization + smooth enzymatic overnight (described in Carrasco et. al, Journal of immunological methods, 2012)

ACTIVATION CULTURE: 10^6 cell/mL with/without PMA/Ionomycin/Brefeldin-A (4 and 6 hours, 37°C, 5% CO₂)

FLOW CYTOMETRY:

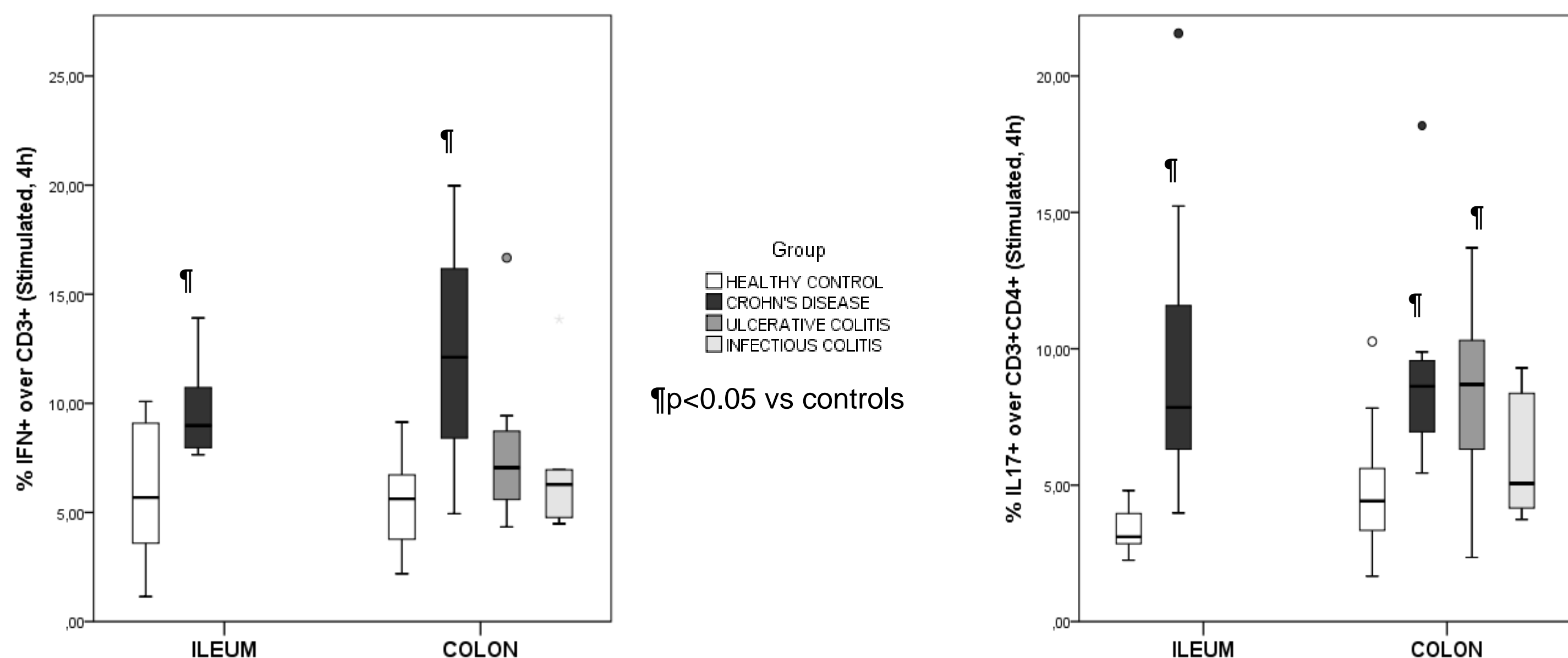
Percentages of Th1 cells (IFN- γ producer) and Th17 cells (IL17-A producer) were assessed by intracellular staining (Fix&Perm kit-Caltag) and adquired on a FACSCalibur (BD). Software analysis: Cell-Quest PRO (BD). Results expressed over low SCC/lineage marker (CD3+ or CD4+) gates.

STATISTICS: Non-parametrical tests for unpaired data. $p < 0.05$

RESULTS

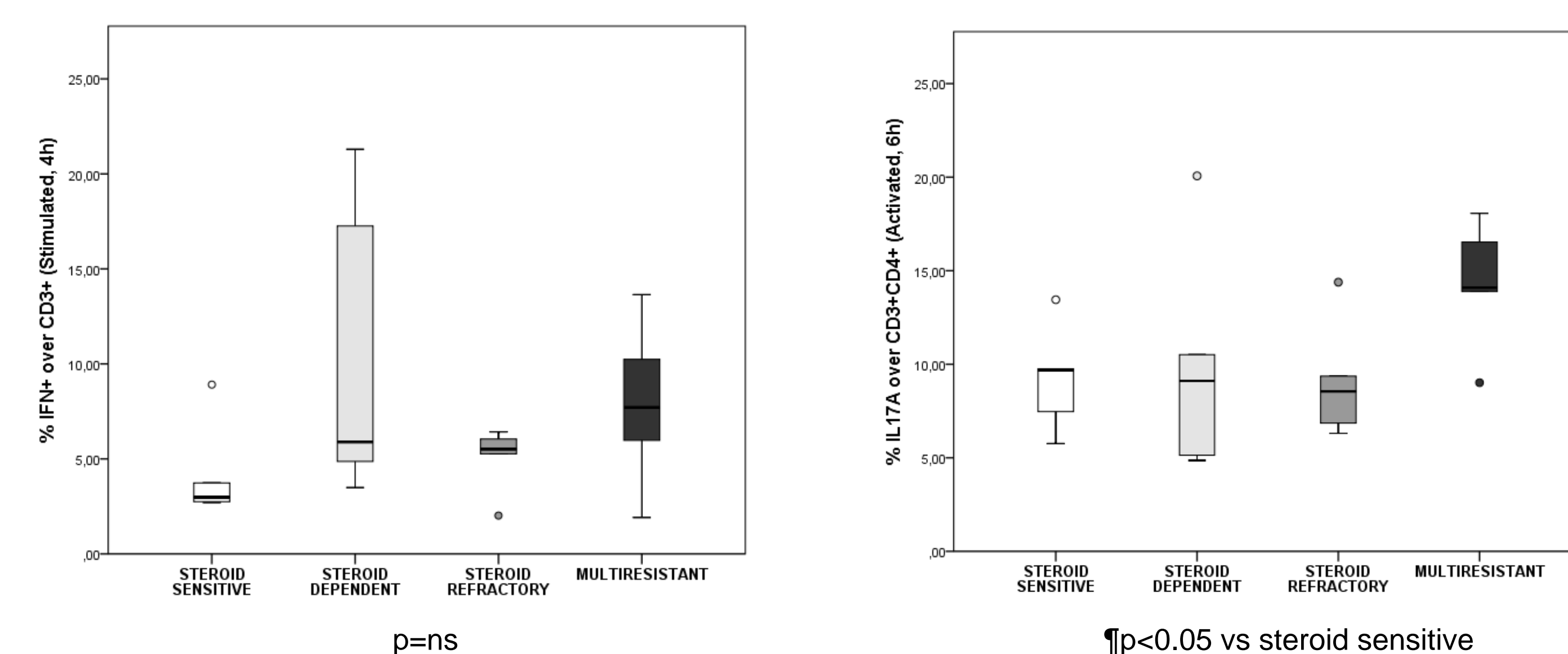
INTESTINAL MUCOSA:

Location & diagnose:



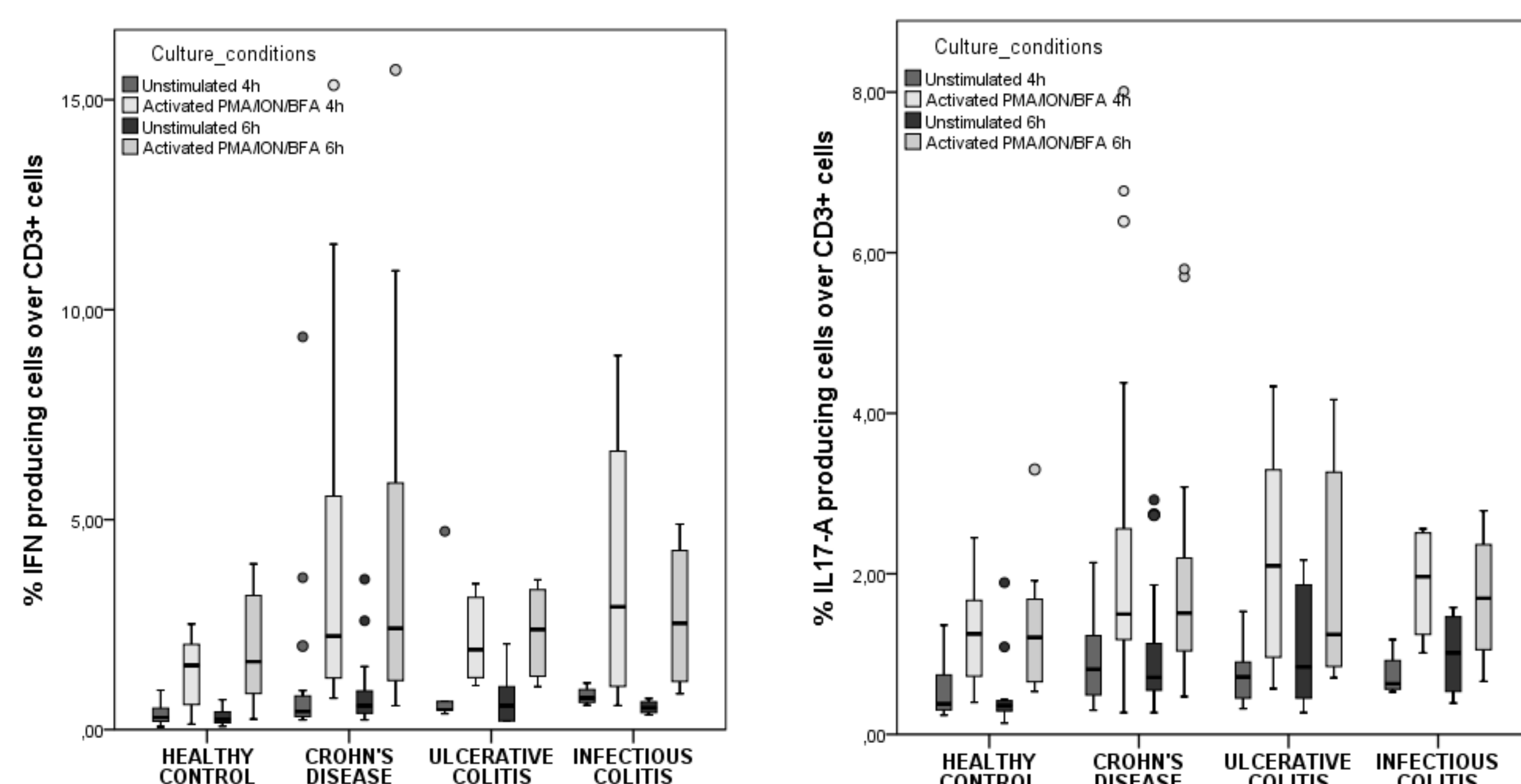
A significant increase in Th1 cells is found in CD (but not UC or IC) in both ileum and colon. Th17 cells are increased in both CD and UC.

CD Mucosa: Steroid response



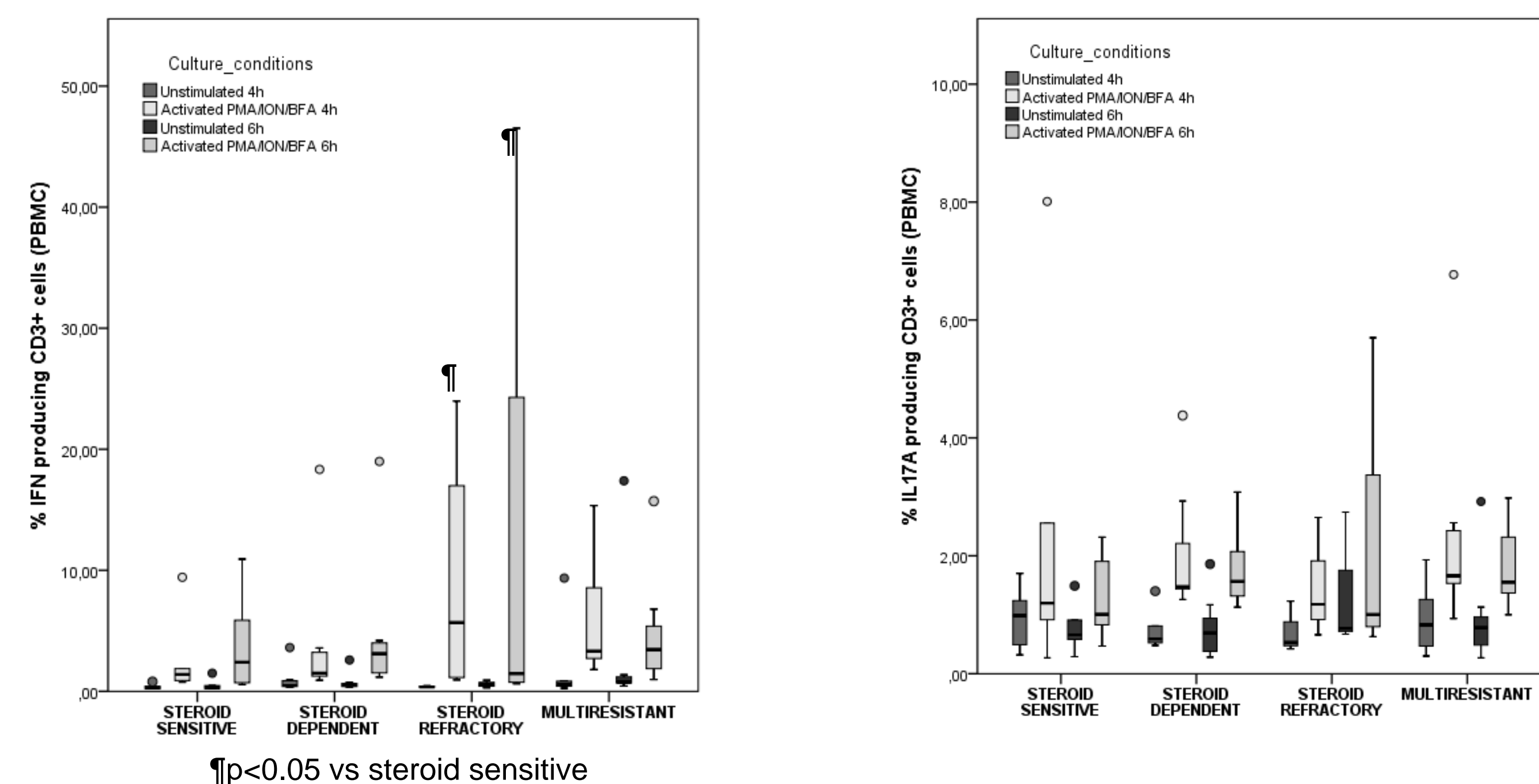
No differences were found according to steroid response in Th1 cells in CD mucosa. Th17 cells were increased only in multiresistant patients (surgical specimen) whereas no differences were found among steroid responders or non responders.

PBMCs: diagnose:



No differences were found in peripheral Th1 and Th17 cells among diagnose groups.

CD PBMC Steroid response



A significant increase in Th1 cells in steroid refractory patients (but not in steroid dependent or multirefractory patients) compared to steroid sensitive patients was found. No differences were found in peripheral Th17 cells among steroid response groups.

Conclusions

1. A Th1 and Th17 response in Crohn's disease is confirmed.
2. A higher peripheral Th1 response is found in steroid refractoriness. However, it is not discriminative enough to be used for diagnostic purposes.

DOUBLE POSITIVE AND DOUBLE NEGATIVE T CELLS IN HUMAN GUT: DIFFERENCES BETWEEN ILEUM AND COLON IN HEALTHY MUCOSA AND INFLAMMATORY BOWEL DISEASES.

A Carrasco, F Fernández-Bañares, Y Zabana, M Aceituno, M Rosinach, X Andújar, C Loras, M Esteve

Hospital Universitari Mutua de Terrassa, CIBERehd, Terrassa, Barcelona, Spain.

Background

Double Positive (DP, CD3+CD4+CD8+) and Double Negative (DN, CD3+CD4-CD8-) T cells are two rare lymphocyte populations in the human gut. Their role in intestinal homeostasis is unknown.

Aim

Evaluate DP and DN T cell percentages in different compartments in healthy intestine and in several inflammatory conditions (Crohn's Disease, Ulcerative Colitis, Infectious colitis and microscopic colitis).

Methods

HEALTHY CONTROLS (n=16):

- Familiar colorectal cancer screening
- Biopsies to ensure microscopic normality
- Paired analysis of 3 compartments: terminal ileum, right colon and left colon

INFLAMMATORY BOWEL DISEASE PATIENTS:

- Active disease and no treatment
- Biopsies from inflamed areas and samples from peripheral blood
- Crohn's Disease, CD (n=20): 7 ileum / 7 right colon / 6 left colon
- Ulcerative Colitis, UC (n=7): 7 left colon
- Infectious Colitis, IC (n=5): 3 right colon / 2 left colon
- Collagenous Colitis, CC (n=14): 14 left colon

LYMPHOCYTE ISOLATION:

- Peripheral blood: Fycoll-Hypaque
- Intestinal mucosa: Smooth desepitelization and overnight enzymatic isolation, as described in Carrasco *et. al*, *Journal of immunological methods*, 2013

FLOW CYTOMETRY:

Antibodies: anti-CD4-PE (clone SK1), anti-CD3-PerCP (clone SK7), anti-CD45-APC,(clone2D1), anti-CD8-APC (clone 3B5) (all from BD biosciences, NJ,USA) DP and DN percentages were evaluated over the CD3/lowSSC gate with Cell-Quest PRO software (BD).

STATISTICS:

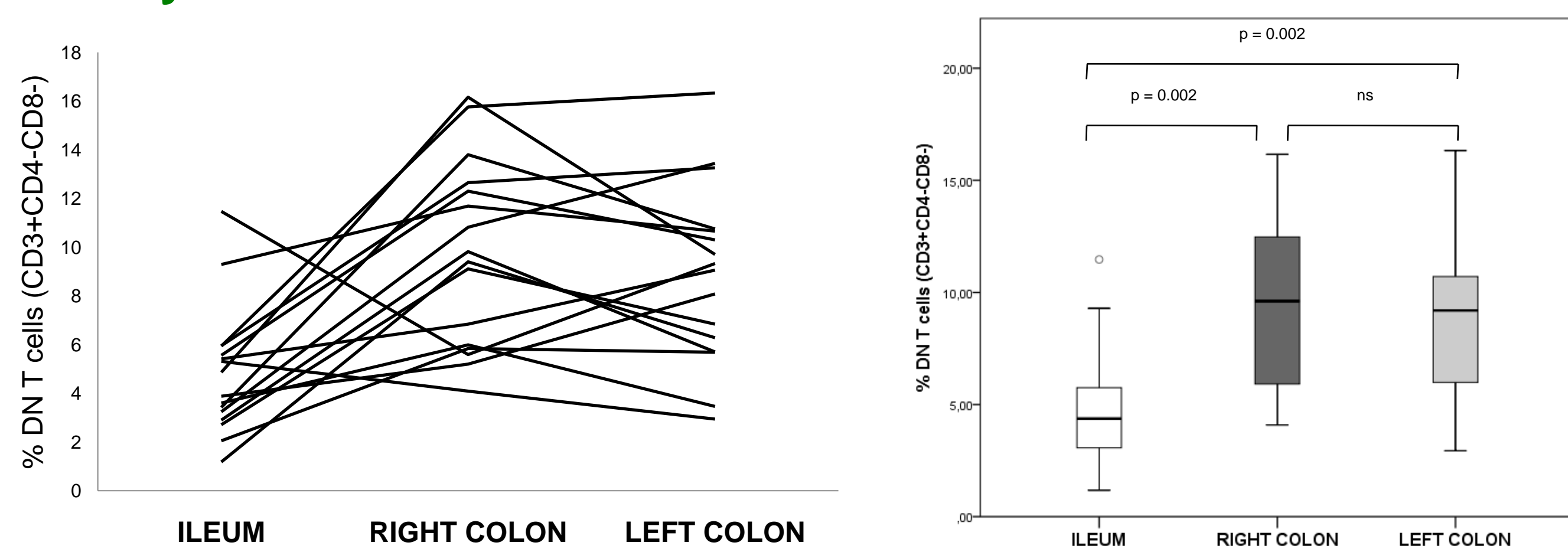
Healthy controls: Non parametric Paired tests (Wilcoxon & Friedman)
Inflammatory bowel disease patients: Non parametric unpaired tests (U-Mann-Whitney & Kruskal-wallis). The inflamed mucosa was compared with their respective healthy counterpart, regarding the location.

Significance if p < 0.05

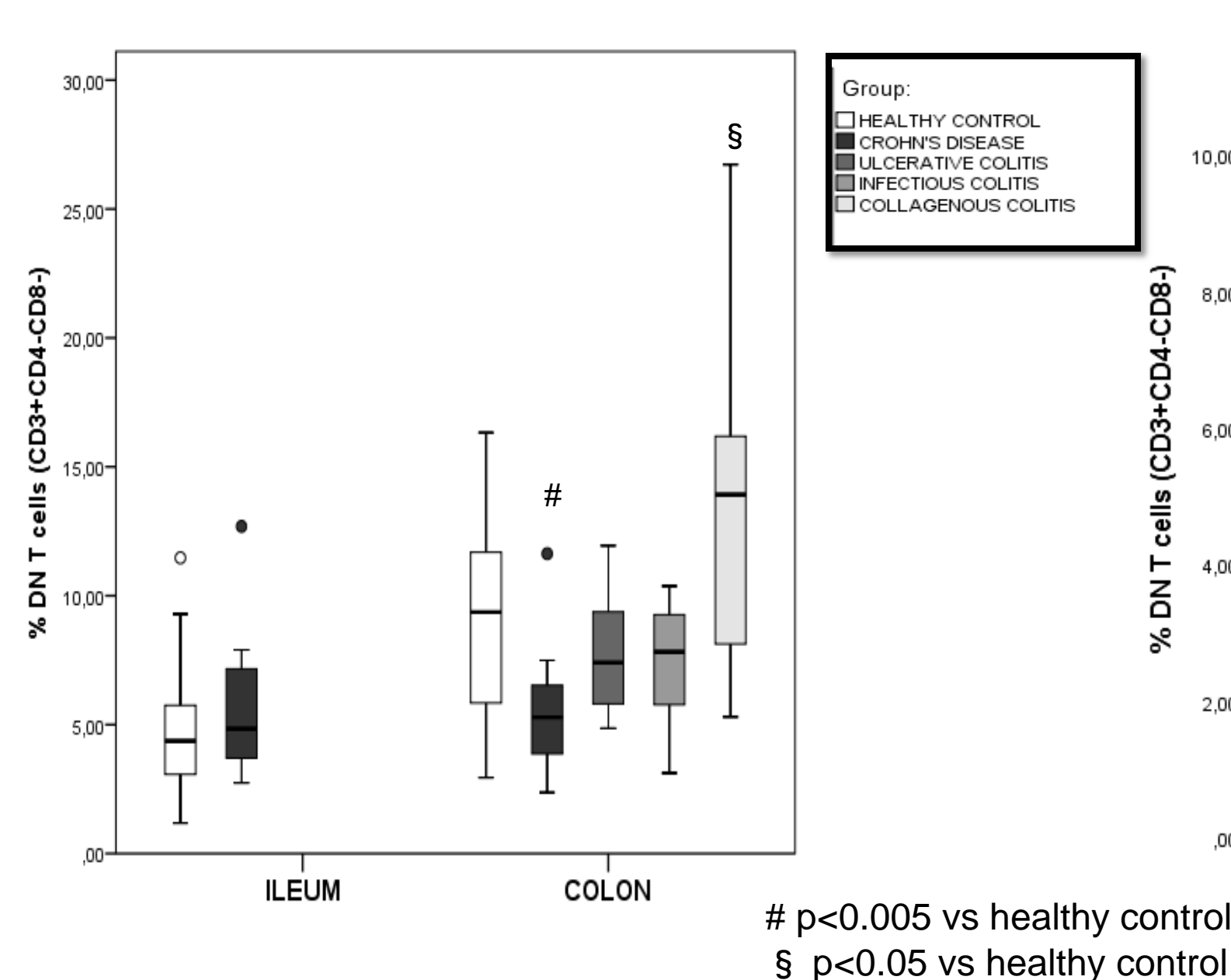
Results

DOUBLE NEGATIVE T CELLS (DN, CD3+CD4-CD8-)

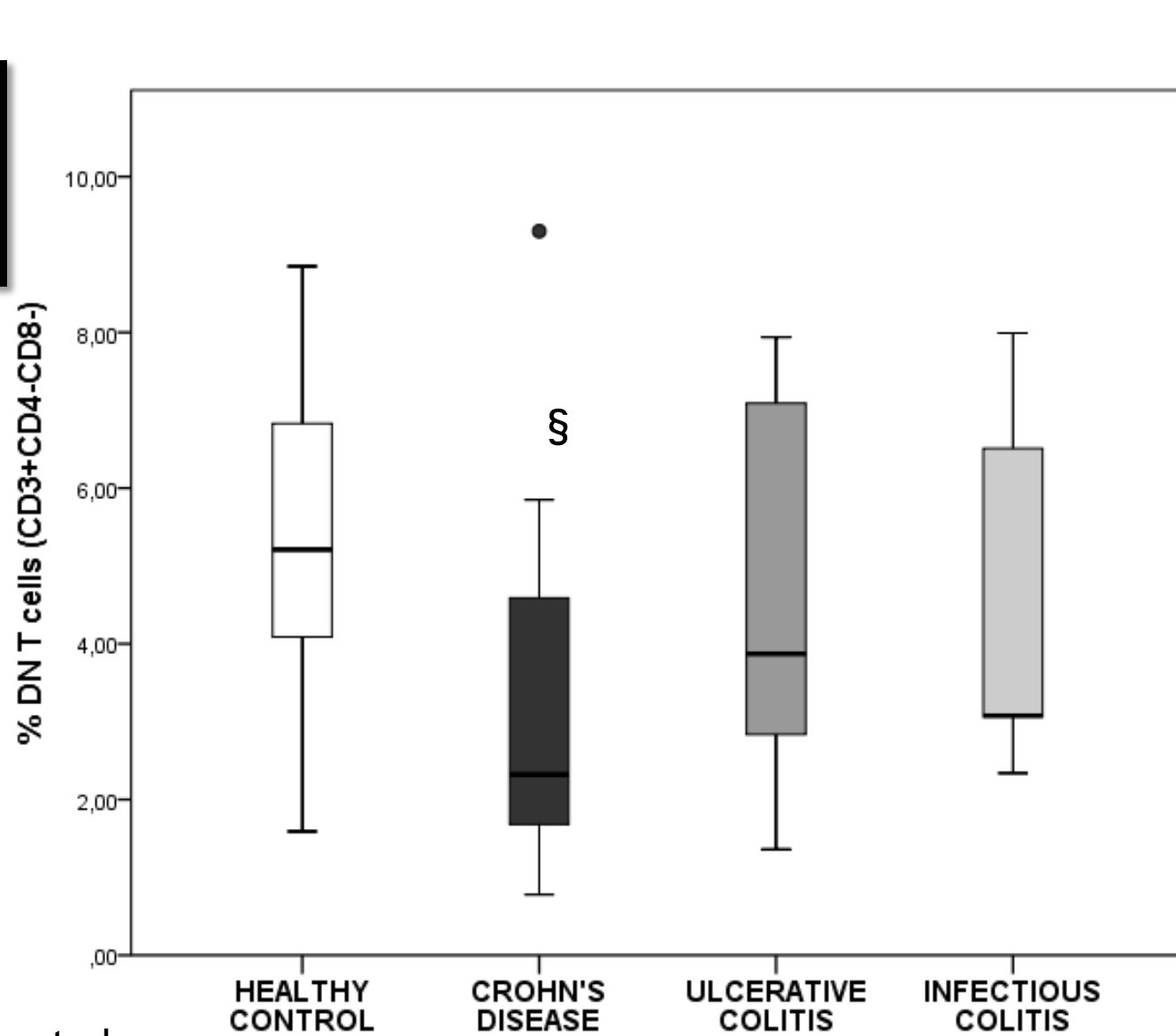
- Healthy intestinal mucosa:



- Inflamed intestinal mucosa

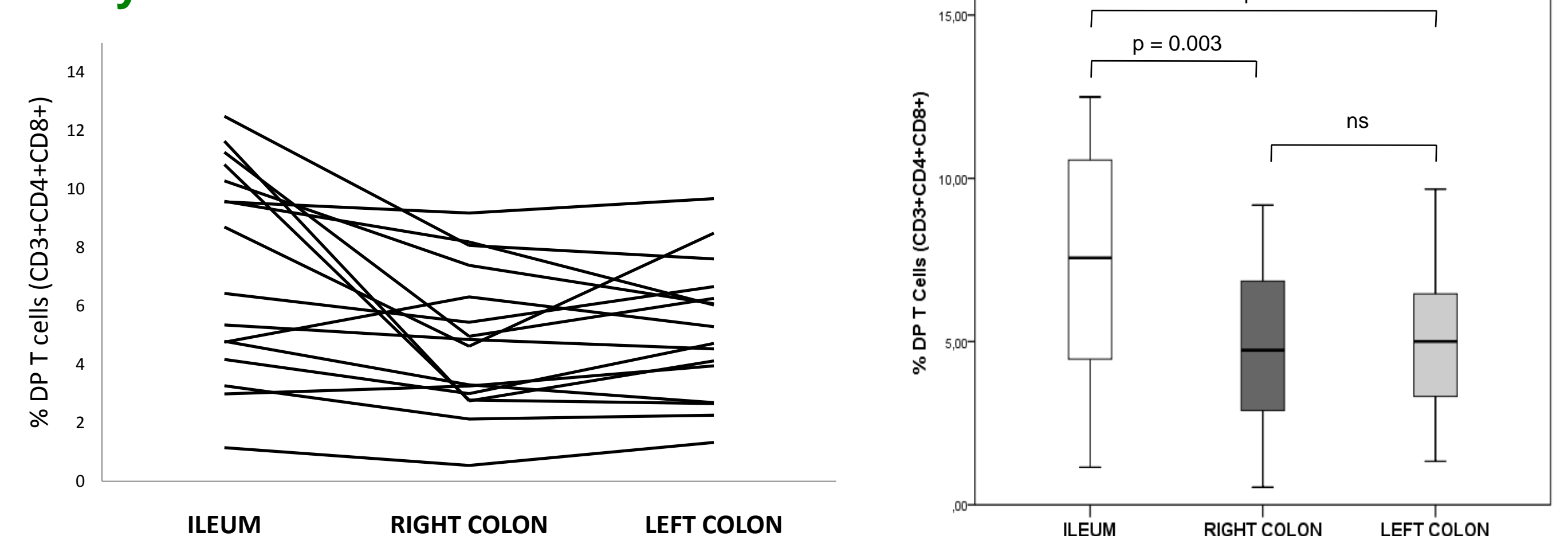


- PBMCs:

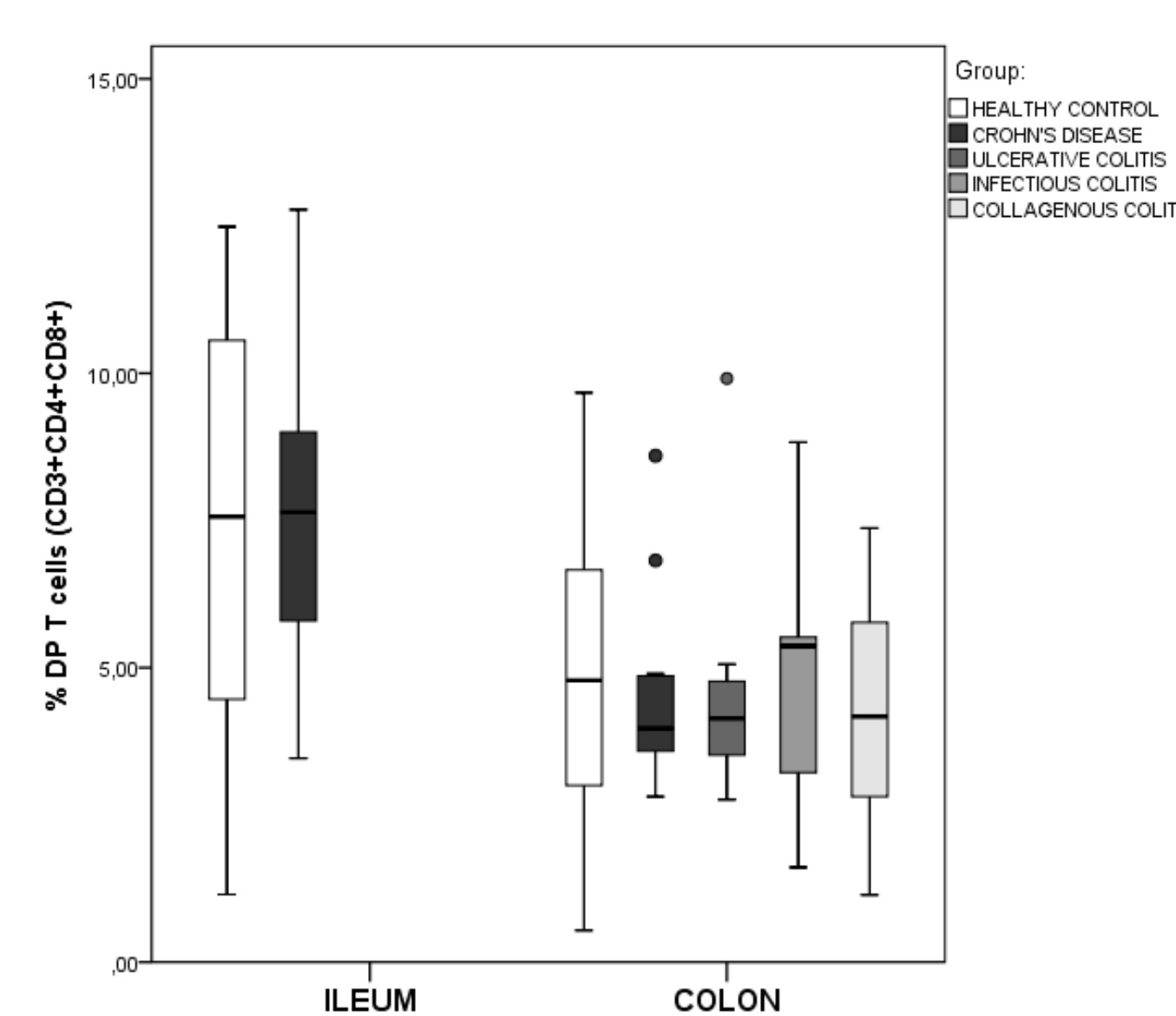


DOUBLE POSITIVE T CELLS (DP, CD3+CD4+CD8+)

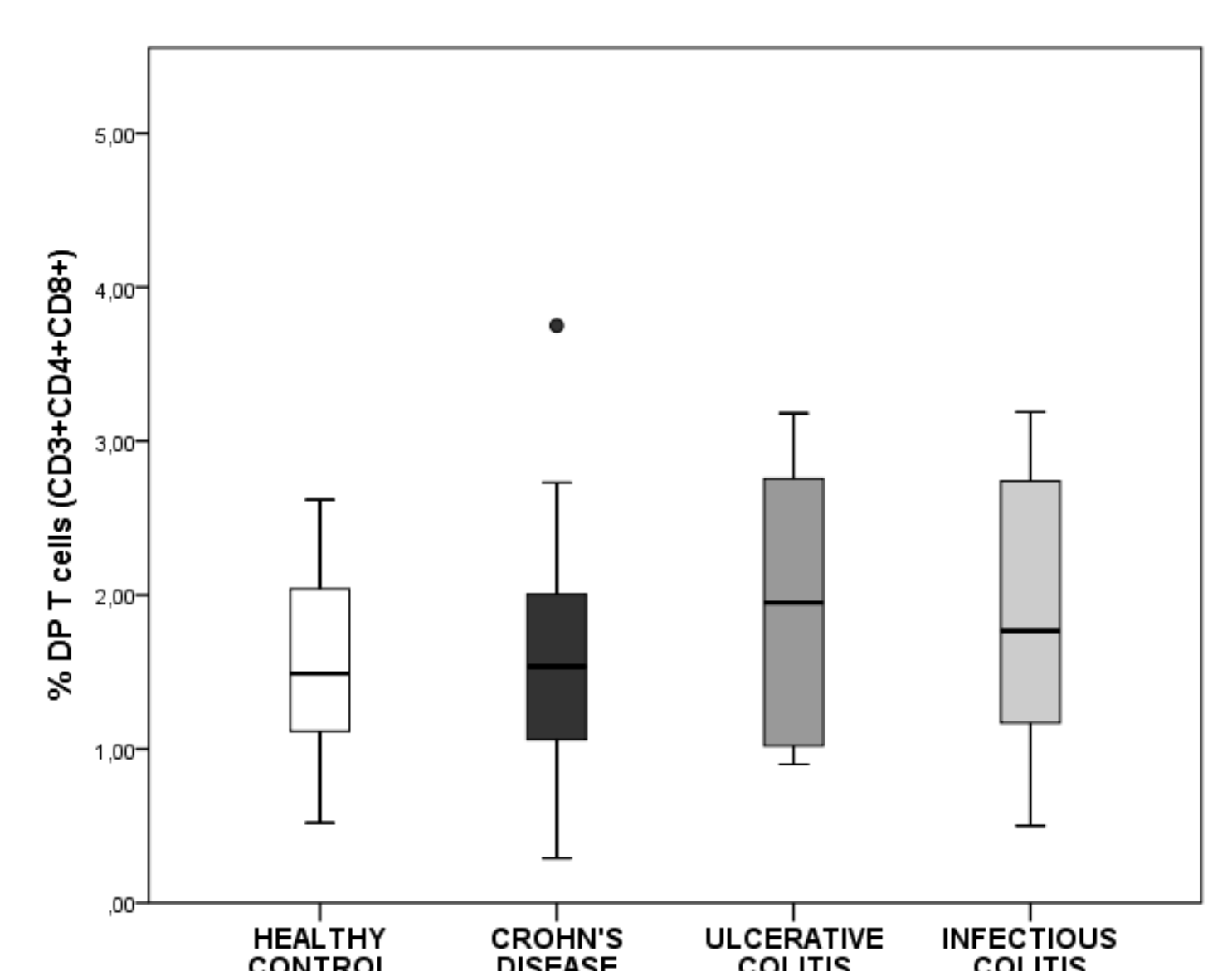
- Healthy intestinal mucosa:



- Inflamed intestinal mucosa:



- PBMCs:



Conclusions

1. DN T cells are increased in colon compared with ileum in healthy mucosa. Patients with CD have a decreased percentage of DN T cells in peripheral blood and inflamed colon, whereas collagenous colitis patients present an increase in colonic affected areas. Those changes could have a relevance in pathophysiology of both diseases.
2. DP T cells are increased in ileal mucosa, in both healthy and inflamed conditions. This increment suggest a role in regulatory mechanisms in intestinal homeostasis. Further studies are necessary to phenotype and characterize this subset and elucidate their role in healthy and inflamed mucosa.

