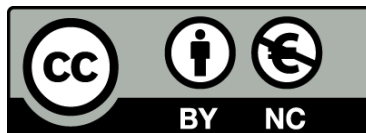




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Desenvolupament i maduració dels limfòcits de l'epiteli i la làmina pròpia de l'intestí de rosegadors durant les primeres etapes de vida

Francisco José Pérez Cano



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència [Reconeixement- NoComercial 4.0. Espanya de Creative Commons](#).

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia [Reconocimiento - NoComercial 4.0. España de Creative Commons](#).

This doctoral thesis is licensed under the [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0. Spain License](#).



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Departament de Fisiologia
Facultat de Farmàcia

DESENVOLUPAMENT I MADURACIÓ DELS LIMFÒCITS DE L'EPITELI I LA LÀMINA PRÒPIA DE L'INTESTÍ PRIM DE ROSEGADORS DURANT LES PRIMERES ETAPES DE VIDA

Programa de Doctorat:
MEDICAMENTS, ALIMENTACIÓ I SALUT
Bienni 1999-2001

Directores:
Dra. ÀNGELS FRANCH i MASFERRER
Dra. MARGARIDA CASTELL i ESCUER

Tutora:
Dra. TRINITAT CAMBRAS i RIU

FRANCISCO JOSÉ PÉREZ CANO
Barcelona, 2004

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA¹





UNIVERSITAT DE BARCELONA



Grup d'Autoimmunitat i Tolerància
Departament de Fisiologia

Facultat de Farmàcia
Edifici B, 3a planta
08028 Barcelona
Tel. 93 402 45 05
Fax 93 403 59 01

Àngels Franch i Masferrer, Professora Titular de Fisiologia, i Margarida Castell i Escuer, Professora Titular de Fisiologia, del Departament de Fisiologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona,

FAN CONSTAR:

Que la memòria titulada **“Desenvolupament i maduració dels limfòcits de l'epiteli i la làmina pròpia de l'intestí prim durant les primeres etapes de vida”** presentada per FRANCISCO JOSÉ PÉREZ CANO per accedir al grau de Doctor en Farmàcia, ha estat realitzada sota la seva direcció al Departament de Fisiologia de la Facultat de Farmàcia, i considerant-la conclosa autoritzen la seva presentació per ser jutjada pel Tribunal corresponent.

I perquè consti i tingui els efectes que corresponguin, signem aquest informe

Dra. Àngels Franch i Masferrer

Dra. Margarida Castell i Escuer

Barcelona, 1 de juny de 2004



ÍNDIX



OBJECTIU	1
INTRODUCCIÓ	5
1. TEIXIT LIMFOIDE ASSOCIAT A L'INTESTÍ O GALT	7
1.1. ORGANITZACIÓ ANATÒMICA I FUNCIONAL DEL GALT	7
1.2. INDUCCIÓ DE LA RESPOSTA IMMUNITÀRIA MUCOSAL.....	9
1.2.1. Captació i transport de l'antigen per cèl·lules M de l'epiteli intestinal	9
1.2.2. Captació de l'antigen de forma paracel·lular.....	10
1.2.3. Captació, processament i presentació de l'antigen per les cèl·lules epitelials.....	11
1.3. POBLACIONS CEL·LULARS EFECTORES DE LA RESPOSTA IMMUNITÀRIA MUCOSAL	12
1.3.1. Limfòcits intraepitelials (IEL).....	14
1.3.1.1. Localització anatòmica dels IEL	14
1.3.1.2. Fenotip cel·lular: heterogeneïtat i tipus.....	15
1.3.1.3. Fenotip, origen i funció dels IEL de tipus a.....	17
1.3.1.4. Fenotip, origen i funció del IEL tipus b	19
1.3.1.5. Propietats funcionals generals dels IEL	20
1.3.1.6. Origen i desenvolupament cel·lular dels IEL: dependència tímica <i>versus</i> criptoplaques.....	21
1.3.2. Limfòcits de làmina pròpia (LPL)	22
1.3.2.1. Localització anatòmica dels LPL.....	22
1.3.2.2. Fenotip i funcions dels limfòcits B i de les cèl·lules plasmàtiques de làmina pròpia	23
1.3.2.3. Fenotip i funcions dels limfòcits T de làmina pròpia	24
2. ESTUDI DEL DESENVOLUPAMENT DEL GALT	25
2.1. DIFERÈNCIES EN L'ONTOGÈNIA DEL GALT ENTRE HUMANS I ROSEGADORS.....	25
2.2. FACTORS INFLUENTS EN EL DESENVOLUPAMENT DEL GALT	26
2.2.1. Microbiota intestinal	26
2.2.2. Antígens alimentaris.....	27
3. RATOLINS TRANSGÈNICS AMB TCR H-Y.....	28

MATERIAL I MÈTODES	31
1. ANIMALS.....	33
1.1. RATES LEWIS	33
1.2. RATOLINS MODIFICATS GENÈTICAMENT	33
2. DISSENYES EXPERIMENTALS	35
2.1. ESTUDI DE L'ONTOGÈNIA DE IEL I LPL DE RATES LEWIS DURANT EL PERÍODE DE LACTÀNCIA	35
2.2. ESTUDI DEL DESENVOLUPAMENT DE IEL CD8 $\alpha\alpha$ + EN RATOLINS TRANSGÈNICS AMB TCR H-Y.....	37
3. OBTENCIÓ DE LIMFÒCITS DE LA MUCOSA INTESTINAL	39
3.1. EXTRACCIÓ DE L'INTESTÍ PRIM	39
3.2. AÏLLAMENT DE LIMFÒCITS INTRAEPITELIALS (IEL)	39
3.2.1. Aïllament de IEL de rata.....	39
3.2.2. Aïllament de IEL de ratolí	40
3.3. AÏLLAMENT DE LIMFÒCITS DE LAMINA PRÒPIA (LPL) DE RATA	41
3.3.1. Mètode per a l'estudi fenotípic de LPL.....	41
3.3.2. Mètode per a l'estudi de cèl·lules secretores d'immunoglobulines.....	42
3.4. PURIFICACIÓ CEL·LULAR	42
3.4.1. Columna de llana de vidre	42
3.4.2. Gradient de Percoll: purificació de cèl·lules mononuclears de rata.....	43
3.4.3. Gradient de Percoll: purificació de cèl·lules mononuclears de ratolí	43
4. OBTENCIÓ DE CÈL·LULES D'ALTRES ÒRGANS LIMFOIDES EN RATOLÍ	44
4.1. OBTENCIÓ DE CÈL·LULES MONONUCLEARS DE TIMUS I MELSA	44
4.2. OBTENCIÓ DE CÈL·LULES PRESENTADORES D'ANTIGEN DE MELSA	44
5. RECOMPTE I DETERMINACIÓ DE LA VIABILITAT CEL·LULAR.....	45
6. ANÀLISI DE LES POBLACIONS LIMFÒCÍTIQUES PER CITOMETRIA DE FLUX... ..	46
6.1. MARCATGE DE LIMFÒCITS PER IMMUNOFLORESCÈNCIA	46
6.1.1. Tècnica de doble marcatge per a l'estudi de IEL i LPL de rata	46

6.1.2. Tècnica de marcatge múltiple per a l'estudi de limfòcits de ratolí.....	46
6.2. CITOMETRIA DE FLUX	48
6.2.1. Anàlisi de limfòcits de rata per citometria de flux.....	48
6.2.2. Anàlisi de limfòcits de ratolí per citometria de flux	49
6.2.3. Aïllament de subpoblacions limfocítiques de ratolí.....	49
7. ASSAIGS CEL·LULARS <i>IN VITRO</i>	51
7.1. TÈCNICA D'ELISPOT PER A LA QUANTIFICACIÓ DE CÈL·LULES SECRETORES D'IMMUNOGLOBULINES	51
7.2. ASSAIG D'ESTIMULACIÓ <i>IN VITRO</i> DE SUBPOBLACIONS LIMFOCÍTIQUES	52
8. DESENVOLUPAMENT DE LA LÍNIA DOBLE TRANSGÈNICA DE RATOLÍ Smcy TCR H-Y.....	53
8.1. OBTENCIÓ DEL PLASMIDI pFABP Smcy	53
8.2. OBTENCIÓ DE LÍNIES TRANSGÈNIQUES DE RATOLINS PER A L'EXPRESSION D'INTESTINAL DE Smcy	55
8.3. CONFIRMACIÓ DE LA PRESENCIA I EXPRESSION DEL TRANSGEN Smcy	55
8.3.1. Extracció de DNA genòmic.....	55
8.3.2. Extracció de RNA.....	56
8.3.3. Quantificació d'àcids nucleics	57
8.3.4. Síntesi del cDNA.....	57
8.3.5. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR).....	57
8.3.6. Electroforesi i visualització dels productes de PCR.....	59
9. ANÀLISI ESTADÍSTICA DELS RESULTATS.....	60
RESULTATS	61
1. CANVIS MORFOMÈTRICS EN L'INTESTÍ PRIM	63
2. ESTUDI DELS CANVIS FENOTÍPICS EN LIMFÒCITS T I CÈL·LULES NK INTRAEPITELIALS DE L'INTESTÍ PRIM DE RATES LACTANTS	65
2.1. PROPORCIÓ DE LIMFÒCITS CD45+ I CD3+.....	65
2.2. CANVIS EN EL FENOTIP DE CÈL·LULES NK INTRAEPITELIALS EN RATES NEONATES	67

2.3. CANVIS EN L'EXPRESSIÓ DE CD4 I CD8 EN IEL DURANT LA LACTÀNCIA	70
2.4. CANVIS EN LES SUBPOBLACIONS DE IEL CD8+ DURANT EL PERÍODE DE LACTÀNCIA	73
2.5. CANVIS EN ELS FENOTIPS DELS IEL CD4+ DURANT EL PERÍODE DE LACTÀNCIA I RATES ADULTES	79
3. CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DE LIMFÒCITS DE LA LÀMINA PRÒPIA D'INTESTÍ PRIM DE RATA DURANT EL PERÍODE DE LACTÀNCIA	81
3.1. DETERMINACIÓ DE LA FINESTRA D'ADQUISICIÓ LIMFOCÍTICA I DE LIMFÒCITS CD45+ A PARTIR DE LES CÈL·LULES DE LA LÀMINA PRÒPIA	81
3.2. DESENVOLUPAMENT DE LIMFÒCITS B I CÈL·LULES SIGA+ EN LP DURANT EL PERÍODE DE LACTÀNCIA	82
3.3. DESENVOLUPAMENT DE LES SUBPOBLACIONS DE LPL CD4+	86
3.4. DESENVOLUPAMENT DE LES SUBPOBLACIONS DE LIMFÒCITS CD8+ A LA LP	88
3.5. DESENVOLUPAMENT DE LES SUBPOBLACIONS DE CÈL·LULES NK EN LP.....	92
4. CAPACITAT SECRETORA D'IMMUNOGLOBULINES A L'INTESTÍ PRIM DE RATA DURANT EL PERÍODE DE LACTÀNCIA	95
5. DESENVOLUPAMENT DE LIMFÒCITS INTRAEPITELIALS EN RATOLINS MASCLES AMB TCR H-Y	96
5.1. APARICIÓ DE IEL CD8 $\alpha\alpha$ +, CD8 $\alpha\beta$ + I CD8- EN L'EPITELI INTESTINAL	96
5.2. APARICIÓ DE LIMFÒCITS CD8 $\alpha\alpha$ +, CD8 $\alpha\beta$ + I CD8- EN TIMUS I MELSA	99
5.3. EFECTE DEL TRACTAMENT AMB EL PÈPTID AGONISTA DEL TCR H-Y SOBRE L'EXPANSIÓ DE IEL CD8 $\alpha\alpha$ +	101
5.4. ESTUDI <i>IN VITRO</i> DELS POSSIBLES PRECURSORS DELS LIMFÒCITS T CD8 $\alpha\alpha$ +	103
5.5. SELECCIÓ ANTIGÈNICA D'UNA ÚNICA POBLACIÓ DE CÈL·LULES CD8+ EN L'INTESTÍ PRIM.....	106
5.5.1. Creació d'una nova línia de ratolins transgènics TCR H-Y amb expressió de Smcy a nivell intestinal.....	106
5.5.2. Expressió intestinal del transgen Smcy.....	107

5.5.3. Desenvolupament de IEL en ratolins transgènics Smcy TCR H-Y	108
5.5.4. Estudi del fenotip de IEL CD8 $\alpha\alpha$ + generats en la femella Smcy TCR H-Y	110
5.5.5. Quantificació de IEL en la femella Smcy TCR H-Y	111
5.5.6. Limfòcits tímics i esplènics en la femella Smcy TCR H-Y	112
DISCUSSIÓ	115
CONCLUSIONS.....	131
BIBLIOGRAFIA.....	137

ABREVIATURES

Ac Mo	Anticòs monoclonal
AEC	3-amino-9-etilcarbazol
Ag	Antigen
AO	<i>Acridine orange</i> . Taronja d'acridina
APC	<i>Antigen-presenting cells</i> . Cèl·lula presentadora d'antigen
APC	<i>Alophiocyanine</i> . Al·lofiocianina.
CD	Cluster de diferenciació
cDNA	<i>Complementary desoxyribonucleic acid</i> . Àcid desoxirribonucleic complementària
CP	<i>Cryptopatches</i> . Criptoplaques
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocyte</i> . Activitat citotòxica dels limfòcits T
dNTP	<i>Desoxynucleotydetriphosphate</i> . Desoxinucleòtids trifosfat
dSI	<i>Distal small intestine</i> . Intestí prim distal
DC	<i>Dendritic cells</i> . Cèl·lules dendrítiques
DN	Cèl·lules doble negatives (CD8-CD4-)
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> . Àcid desoxirribonucleic.
DP	Cèl·lules doble positives (CD8+CD4+)
DTT	1,4-Ditiotreitol
EB	<i>Ethidium bromide</i> . Bromur d'etidi
EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic
ELISPOT	Enzyme-lynked immunospot technique
FABP	Fatty acid binding protein promoter. Promotor de la proteïna lligant d'àcids grassos
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> . Sèrum boví fetal
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> . Isotiocianat de fluoresceïna.
GALT	<i>Gut-associated lymphoid tissue</i> . Teixit associat a la mucosa intestinal
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> . Antigen leucocític humà
IEL	<i>Intraepithelial lymphocyte</i> . Limfòcits intraepitelial
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunoglobulina
IL	<i>Interleukin</i> . Interleucina
Kb	Kilobase
LFV	<i>Lymphocyte filled villi</i>

LP	Lamina pròpia
LPL	<i>Lamina propria lymphocytes</i> . Limfòcits de la làmina pròpia
MALT	<i>Mucosal-associated lymphoid tissue</i> . Teixit limfoide associat a mucoses
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> . Complex major d'histocompatibilitat
NK	<i>Natural killer</i> . Cèl·lules assassines naturals
Pb	Parell de bases
pSI	<i>Proximal small intestine</i> . Intestí prim proximal
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> . Reacció en cadena de la polimerasa.
PE	<i>Phycoeritrin</i> . Ficoeritrina.
PP	Plaques de Peyer
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> . Àcid Ribonucleic
RNasa	Ribonucleasa
RT	Reverse ranscription. Retrotranscripció
Rag	<i>Recombination activation genic</i> . Gens activadors de la recombinació genètica
SC	<i>Secreting Cell</i> . Cèl·lula secretora
SCF	<i>Stem Cell Factor</i> . Factor cel·lular de creixement.
TCR	<i>T-cell receptor</i> . Receptor de cèl·lules T
TGF- β	<i>Transformig growth factor</i> . Factor transformador de creixement.
Th	<i>T helper</i> . T col·laborador
TL	<i>Thymic leukemia antigen</i> . Antigen de la leucèmia tímica.

OBJECTIU

El sistema immunitari associat a l'intestí o GALT constitueix el teixit defensiu més extens de l'organisme, fet que reflecteix la seva importància funcional. Forma part del sistema immunitari associat a mucoses, caracteritzat per la seva capacitat sintetitzar i secretar immunoglobulines, i pel tràfic de cèl·lules immunocompetents entre les diferents mucoses, el que confereix un paper protector general a nivell mucosal. El GALT presenta característiques anatòmiques i funcionals particulars que el distingeixen del sistema immunitari sistèmic. Dins d'aquest teixit limfoide existeixen uns compartiments efectors, constituïts pels limfòcits de l'epiteli i de la làmina pròpia, que contenen tipus cel·lulars únics, amb un fenotip activat permanentment, alguns dels quals tenen encara un origen i una funció desconeguts.

El desenvolupament del GALT té lloc durant la vida fetal i la seva activació s'inicia a partir del naixement i durant els primers dies de vida, coincidint amb la ingesta dels primers aliments i la instauració de la flora microbiana. Aquests estímuls antigènics tenen un important paper fisiològic en la maduració del GALT. A més a més d'aquests factors exògens, altres factors endògens com el nivell d'eficiència de presentació antigènica, la formació del complex antígen-receptor dels limfòcits T o d'altres també podrien estar implicats en el desenvolupament de les poblacions efectores del GALT.

Amb aquests plantejaments, l'objectiu d'aquesta tesi ha consistit en establir el desenvolupament del teixit limfoide associat a intestí prim durant les primeres etapes de vida. Per assolir aquest objectiu, s'han establert tres objectius específics.

El primer objectiu plantejat ha estat el determinar el desenvolupament fenotípic de les principals poblacions efectores -limfòcits intraepitelials i de làmina pròpia- de la mucosa intestinal. Aquest anàlisi s'ha portat a terme en rates neonates des del dia del naixement i durant tot el període de lactància.

El segon objectiu ha consistit en establir la maduració de la capacitat secretora d'immunoglobulines de la mucosa intestinal a partir del dia de naixement. Aquest estudi també s'ha realitzat en rates lactants.

El tercer objectiu s'ha centrat en esbrinar l'origen i el desenvolupament d'una subpoblació limfocítica específica del compartiment mucosal, els limfòcits intraepitelials $CD8\alpha\alpha+TCR\alpha\beta+$, i la seva relació amb els processos de selecció tímica i presentació antigènica. En aquest cas, s'han utilitzat models de ratolins transgènics i s'ha desenvolupat una nova línia doble transgènica. Aquesta part de la tesi s'ha desenvolupat al *Center of Immunology, University of California, Irvine*.

INTRODUCCIÓ

1. TEIXIT LIMFOIDE ASSOCIAT A L'INTESTÍ O GALT

El teixit limfoide associat a l'intestí, conegut per l'acrònim GALT (*gut-associated lymphoid tissue*), constitueix el teixit limfoide més extens de l'organisme, fet que reflecteix l'important paper defensiu d'aquest compartiment. El GALT forma part del sistema immunitari mucosal (*mucosal-associated lymphoid tissue*, MALT), el qual també inclou, entre d'altres, els teixits associats a bronquis (Sminia i col., 1989), a l'aparell uro-genital i d'altres associats a conductes exocrins (Nair i col., 1986).

El GALT i, en general, els diferents compartiments del MALT presenten característiques anatòmiques i funcionals diferents del sistema immunitari sistèmic (Shanahan i col., 1994). A més a més, una característica important del sistema immunitari mucosal és el tràfic intermucosal que presenten els elements d'aquest sistema immunitari, de forma que una resposta immunitària originada en una mucosa, confereix protecció en altres mucoses de l'organisme.

1.1. ORGANITZACIÓ ANATÒMICA I FUNCIONAL DEL GALT

El GALT està format per diferents compartiments que s'agrupen en teixits limfoides organitzats i poblacions cel·lulars distribuïdes de forma difusa. El GALT organitzat està format per fol·licles limfàtics agregats que donen lloc a les plaques de Peyer (PP), fol·licles aïllats i ganglis limfàtics mesentèrics (**Figura 1**).

El GALT difús consisteix en dues poblacions diferents que es troben per sobre i per sota de la membrana basal: els limfòcits intraepitelials (IEL) i les cèl·lules mononuclears de la làmina pròpia, que inclouen els limfòcits de la làmina pròpia (LPL). A diferència del GALT organitzat, el qual conté principalment precursors verges de limfòcits B i T, els IEL i els LPL estan constituïts principalment per cèl·lules efectoras. Concretament, els IEL contenen limfòcits T i a la làmina pròpia hi ha limfòcits T i B i cèl·lules plasmàtiques productores d'immunoglobulines (Ernst i col., 1985).

Per tant, l'estructura del sistema immunitari mucosal es pot considerar dividida en dos nivells: inductor i efector. El principal element inductor, on s'inicia la resposta immunitària quan entra en contacte amb l'antigen, és el GALT organitzat: PP i fol·licles aïllats.

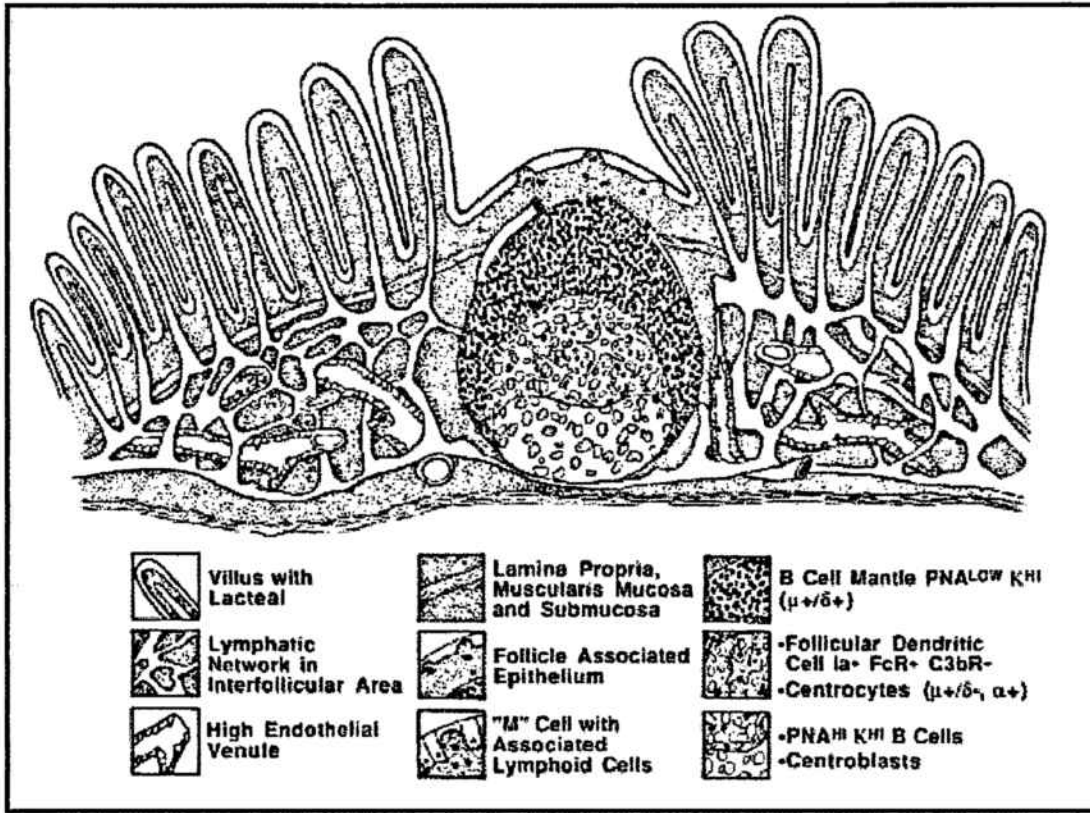


Figura 1

Esquema de la situació d'una placa de Peyer (PP) a l'intestí prim. Les PP formen part del teixit limfòide mucosal organitzat i juguen un paper molt important en el procés d'activació limfocítica.

La presentació antigènica a cèl·lules B i T verges, provoca l'expansió clonal de precursors específics per a l'antigen -fonamentalment precursors de limfòcits B productors d'IgA-, que s'activen i migren mitjançant els conductes limfàtics eferents cap als ganglis limfàtics mesentèrics on es repeteixen novament processos de maduració i multiplicació. Des d'aquí continuen la seva migració i maduració i assoleixen la circulació sanguínia a través del conducte toràcic. Des del compartiment sanguini els limfòcits efectors es reparteixen específicament a la làmina pròpia i a l'epiteli intestinal dirigits per receptors organospecífics (*homing receptors*) (Arstila i col., 2000). Aquest procés requereix aproximadament una setmana (Keren, 1989). Un determinat nombre de cèl·lules B derivades del GALT i probablement també limfòcits T, migraran a altres teixits mucosals extraintestinals (tracte respiratori, glàndules mamàries i glàndules salivals), fenomen que dona lloc a la denominació de sistema immunitari mucosal comú (Mestecky 1987; De Witt i col., 1999).

1.2. INDUCCIÓ DE LA RESPOSTA IMMUNITÀRIA MUCOSAL

La resposta immunitària mucosal s'inicia quan l'antigen penetra la barrera mucosal i és presentat als limfòcits efectors de forma immunogènica.

Les molècules potencialment immunogèniques poden penetrar a través de la barrera mucosal, principalment, per tres vies: a través de cèl·lules M, que són cèl·lules especialitzades que es troben cobrint els fol·licles limfàtics, a través d'una via paracel·lular i directament a través de les cèl·lules epitelials (Figura 2). La naturalesa de l'antigen (mida i solubilitat) determina la via d'entrada. Després de travessar l'epiteli intestinal, els antigens han de ser presentats als limfòcits per cèl·lules presentadores d'antigen (APC) (Kelsall i Strober, 1999).

1.2.1. CAPTACIÓ I TRANSPORT DE L'ANTIGEN PER CÈL·LULES M DE L'EPITELI INTESTINAL

Les cèl·lules M, també conegudes com a cèl·lules limfo-epitelials o cèl·lules epitelials associades a fol·licles, són cèl·lules epitelials especialitzades amb una fina membrana amb microplegaments, interposades entre cèl·lules amb funció absortiva entre l'epiteli, recobrint agregats cel·lulars i fol·licles limfocítics al llarg de tot el tracte gastrointestinal. Presenten la vora en forma de raspall, poc desenvolupada, reduïda activitat enzimàtica, un tipus de citoesquelet específic i una gran capacitat de formació de vesícules endosòmiques (Gebert i col., 1995; Kernels i col., 1996; Rauteberg i col., 1996). Tots aquests trets fan que les cèl·lules M estiguin estructuralment adaptades per tal de facilitar el transport de macromolècules des del lumen al sistema immunitari mucosal. Les cèl·lules M poden captar macromolècules, microorganismes i fins i tot virus, des de la seva superfície apical i transportar-los cap a la seva superfície basal sense patir processos degradatius i alliberant els antigens per exocitosi davant les cèl·lules mononuclears dels fol·licles limfàtics agregats, on les cèl·lules accessòries processaran i presentaran els antigens als limfòcits de l'agregat.

Les cèl·lules M presenten molècules del complex major d'histocompatibilitat de classe II (MHC-II) i per això s'havia cregut que podien estar involucrades en la presentació antigènica de forma similar als macròfags o les cèl·lules dendrítiques (Brandtzaeg, 1990; Keren i col., 1992; Allan i col., 1993). Avui dia aquesta funció no es considera probable a causa del seu nombre limitat, la baixa possibilitat d'interacció amb els limfòcits T en les PP i l'elevat nombre existent d'altres tipus cel·lulars especialitzats en aquesta funció.

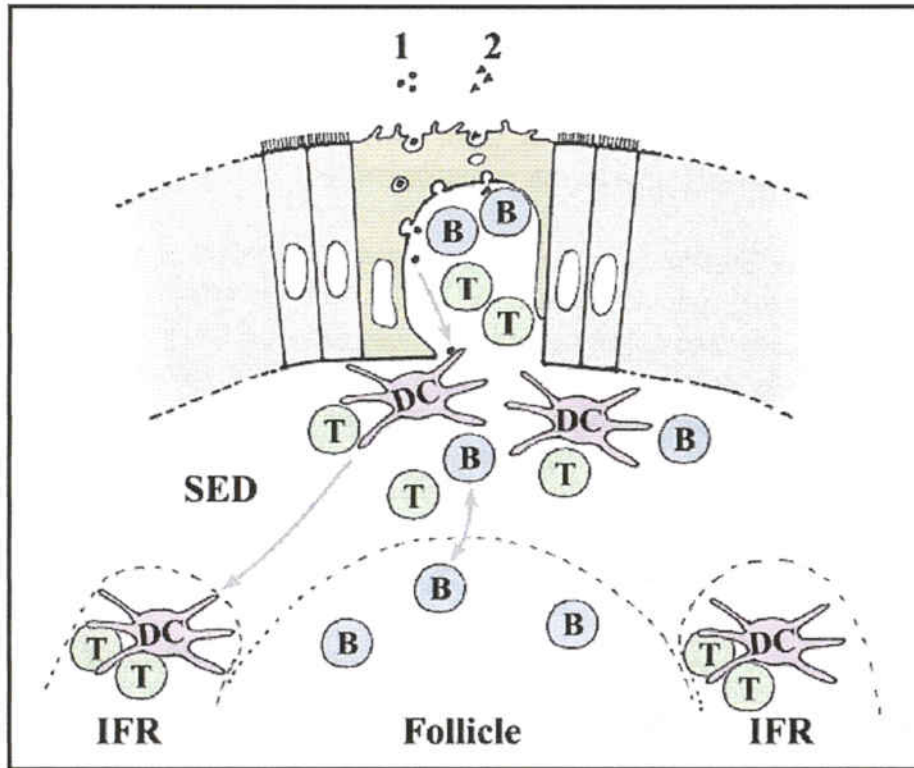


Figura 2

Diagrama del model de captació i transport de l'antigen a través de la barrera mucosa, mitjançant les cèl·lules M, de forma paracel·lular o a través dels enteròcits. Una vegada els antigens travessen la barrera poden ser captats per cèl·lules dendrítiques (DC) de la regió subepitelial. Aquestes cèl·lules dendrítiques poden processar l'antigen localment o migrar a regions interfol·liculars adjacents i/o ganglis limfàtics mesentèrics per tal d'interactuar amb les cèl·lules T, o d'altra banda, poden interactuar directament amb les cèl·lules B. Modificat de Neutra i col. (2001).

1.2.2. CAPTACIÓ DE L'ANTIGEN DE FORMA PARACEL·LULAR.

En circumstàncies normals, l'aigua, els electròlits i alguns polipèptids de cadena curta poden passar a través de les unions intercel·lulars dels enteròcits, però la presència d'unions oclusives restringeixen o eviten el pas de macromolècules (Madara i col., 1992). malgrat tot, en circumstàncies on es produeix inflamació intestinal aguda, la secreció d'interferó γ (IFN- γ) i la migració transepitelial de neutròfils provoquen la pèrdua d'aquestes unions i s'incrementa la permeabilitat intestinal (Madara i col., 1989; Nash i col., 1991; Parkos i col., 1991).

Quan les molècules antigèniques s'obren pas entre les cèl·lules epitelials i assoleixen la lamina pròpia, són captades per APC específiques de la làmina pròpia, com macròfags i cèl·lules dendrítiques, les quals processaran aquestes molècules i posteriorment les presentaran a les poblacions limfocítiques efectores (Unanue i col., 1987; Kelsall i col., 1999). Aquests pèptids antigènics són presentats sobre la superfície cel·lular combinats a les molècules del MHC de classe II (Benacerraf i col., 1985; Yewdell i col., 1990; Brodsky i col., 1991; Jorgensen i col., 1992) o, com també s'ha demostrat, combinats amb molècules MHC de classe I (Lanzavecchia 1996) que poden ser reconegudes per receptors de cèl·lules T (TCR). Els limfòcits B de les PP també poden actuar com a APC eficients.

1.2.3. CAPTACIÓ, PROCESSAMENT I PRESENTACIÓ DE L'ANTIGEN PER LES CÈL·LULES EPITELIALS

Els antígens solubles poden ser endocitats per cèl·lules epitelials (Neutra i col., 1993; Tizard, 2002). Aquestes cèl·lules els alliberen al costat basolateral i, aleshores, cèl·lules APC especialitzades poden captar-los i iniciar la resposta efectora. Durant aquest procés, les cèl·lules epitelials secreten una ampla gamma de citocines que regulen la possible reacció inflamatòria de la mucosa intestinal. Donat el gran nombre de cèl·lules epitelials a la superfície intestinal, la captació antigènica per aquesta via pot ser immunològicament rellevant.

S'ha descrit que les cèl·lules epitelials de les superfícies mucoses, particularment els enteròcits de l'epiteli de l'intestí prim i del còlon, expressen constitutivament molècules MHC, encara que en baixa densitat (Mayer i col., 1991; Whiting i col., 1990). A l'intestí prim, la molècula MHC-II més expressada és la molècula HLA-DR, mentre que les molècules HLA-DP i HLA-DQ tenen un baix o nul nivell d'expressió (Whiting i col., 1990; Mayer i col., 1991). En el còlon, l'expressió epitelial de molècules del MHC-II no és tan evident com en el cas de l'intestí prim. L'expressió de MHC-II als enteròcits està regulada per citocines, especialment per IFN- γ (Bland i col., 1988; Brandtzaeg i col., 1989;) i per l'exposició a l'antigen, tant antígens ambientals com toxines (Wilson i col., 1990).

A més a més, s'ha demostrat la capacitat dels enteròcits per actuar com a APC *in vitro*. Així, els enteròcits humans tenen capacitat de processar al toxoide tetànic i d'activar els limfòcits T (Mayer i col., 1987). Aquesta presentació comporta una activació selectiva de cèl·lules T CD8+, en contrast amb l'activació convencional per APC de cèl·lules T CD4+. Aquest fenomen ha de tenir algun paper fisiològic, ja que la majoria dels limfòcits intraepitelials són CD8+.

Aquests fets, entre d'altres, mostren el possible paper de les cèl·lules epitelials com a presentadores d'antigen. Ara bé, l'activació selectiva de cèl·lules T CD8+ sembla contradir el dogma immunològic tradicional que restringeix l'activació de cèl·lules T CD8+ pels complexos de tipus MHC-I mentre que l'activació de cèl·lules T CD4+ està restringida per les molècules MHC-II (Mayer i col., 1991). En aquest sentit, s'ha postulat l'existència d'una molècula MHC-I de tipus no clàssic que s'uniria a la molècula CD8 dels IEL. Actualment s'ha demostrat l'existència d'aquest tipus de molècules i s'està estudiant la seva implicació en els processos d'expansió i activació d'un subtipus específic de IEL (Tsujimura i col., 2001).

1.3. POBLACIONS CEL·LULARS EFECTORES DE LA RESPOSTA IMMUNITÀRIA MUCOSAL

Un cop s'ha produït la captació i processament de l'antigen per qualsevol de les vies d'entrada detallades, se'l presenta a les poblacions efectores mitjançant APC professionals o per cèl·lules epitelials que actuen com a tals.

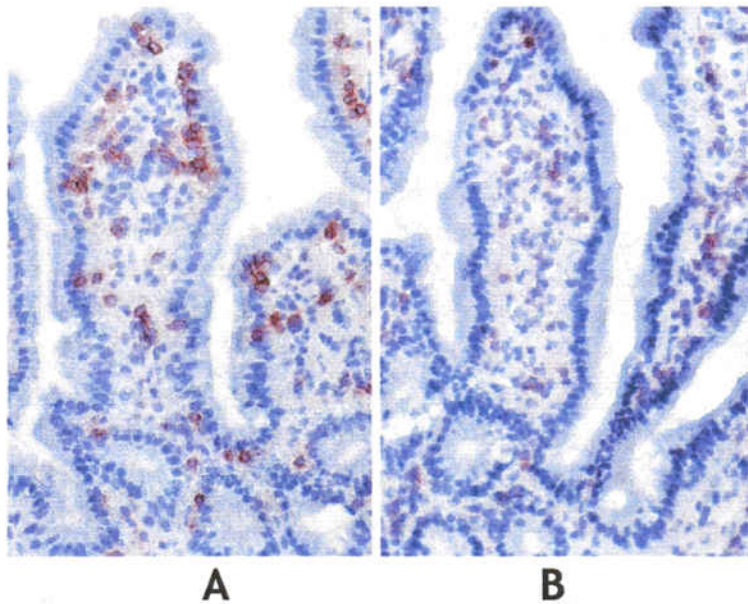


Figura 3

Imatge de vellositats intestinals tenyides amb hematoxilina-eosina i amb AcMo anti-CD8 (A) i anti-CD4 (B). El marcatge immunohistoquímic de la molècula CD8 posa de manifest la gran proporció de limfòcits CD8+ presents en el compartiment intraepitelial (IEL), mentre que el marcatge específic anti-CD4 revela la presència de limfòcits CD4+ a la LP (LPL) mentre que es pràcticament absent en el compartiment intraepitelial. Imatges cedides per la Prof. Dra. Victoria Camerini (University of California, Irvine)

Com s'ha esmentat, existeixen dos tipus diferents de subpoblacions efectores: els limfòcits intraepitelials (IEL) i les cèl·lules mononuclears i limfòcits de la làmina pròpia (LPL) (Figura 3). Els IEL executen principalment una resposta immunitària cel·lular, mentre que els LPL, que contenen una gran proporció de limfòcits B, porten a terme la resposta humoral de la defensa mucosal.

IEL i LPL estan constituïts per cèl·lules que connecten els diferents compartiments mucosals o fins i tot altres òrgans del cos (Figura 4). Així, el fet que la reordenació gènica del TCR d'un subtipus específic de IEL sigui comú en la LP intestinal i en blasts CD8⁺ del conducte toràcic (Arstila i col., 2000) suggereix que aquests IEL són estimulats en agregats limfoides intestinals, com les PP, o en àrees extrafol·liculars de l'intestí (Nanno i col., 1994), d'on posteriorment es dirigeixen, via ganglis limfàtics mesentèrics, fins al conducte toràcic i a sang. Un cop en el torrent sanguini es distribueixen per la LP de l'intestí prim i gros.

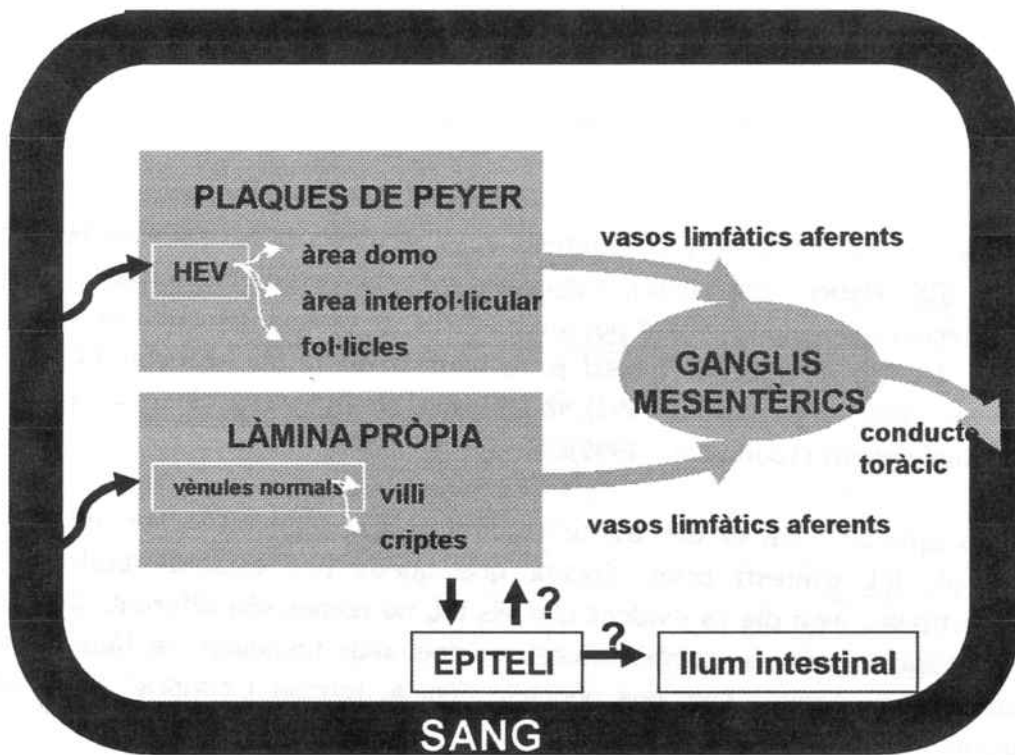


Figura 4

Migració limfocítica en el sistema immunitari intestinal. Els limfòcits entren a les PP a través de les vèrdules endotelials, mentre que l'entrada de limfòcits a la LP està mediada via sanguínia a la mucosa intestinal. Modificada de Rothkötter i col. (1999).

Des de la LP, els limfòcits entren a l'epiteli amb una eficiència variable i continua l'intercanvi entre els dos compartiments (Beagly i col., 1998). Observacions al microscopi electrònic i immunohistoquímiques suggereixen el retorn d'uns tres IEL per hora cap a la LP (Arstila i col., 2000) així com el seu alliberament al lumen intestinal (Regoli i col., 1994).

De forma paral·lela, una part dels limfòcits B estimulats, en els llocs inductors com les PP (Kelsall i col., 1999), es diferencien a cèl·lules plasmàtiques amb capacitat productora d'IgA. Aquests blasts sIgA+ i cèl·lules plasmàtiques recirculants tenen afinitat per totes les superfícies mucoses corporals, de forma que no només arriben a l'aparell gastrointestinal sinó que també arriben al tracte respiratori, uro-genital i a les glàndules mamàries (Brandtzaeg, 1998). Aquest fet implica que el contacte amb l'antigen en un punt determinat permetrà que se sintetitzin anticossos i que hi hagin respostes secundàries en localitzacions llunyanes a la posició de contacte inicial.

1.3.1 LIMFÒCITS INTRAEPITELIALS (IEL)

La presència de limfòcits en l'epiteli intestinal va ser descrita per primera vegada a mitjans del segle XIX (Weber i col., 1847). Posteriorment s'ha estudiat extensament i és objecte d'especulació i un camp fascinant per anatomistes, fisiòlegs i immunòlegs (Shanahan i col., 1994). El fenotip de IEL de l'intestí prim humà i de ratolí ha estat ben caracteritzat (Lefrancois 1991; Trejdosiewicz 1992), mentre que en altres espècies, com la rata, hi ha un menor coneixement (Todd i col., 1999).

En altres epitelis, com el del tracte respiratori i uro-genital, s'han observat cèl·lules similars als IEL d'intestí prim. Encara que queda per establir totalment les seves característiques, avui dia és evident que els IEL no només són diferents dels limfòcits de sang perifèrica, sinó que també difereixen dels seus homòlegs de làmina pròpia i per aquesta raó són definits com una població "única, inusual i curiosa" (Erns i col., 1985; Lefrancois 1991).

1.3.1.1. Localització anatòmica dels IEL

A l'intestí prim d'una persona adulta sana, la presència de IEL és d'uns 10-20 per cada 100 enteròcits (Ferguson, 1977). Aquest nombre tendeix a decreixer progressivament en la part

distal de l'intestí i particularment en el còlon (Ferguson i col., 1971, 1986; Dobbins i col., 1986). Els IEL estan localitzats en la part basal de l'epiteli, just per sobre de la membrana basal i per sota de les unions interepiteliales. Considerant la immensa àrea superficial de l'epiteli intestinal, els IEL representen una important proporció de les cèl·lules T de tot l'organisme.

1.3.1.2. Fenotip cel·lular: heterogeneïtat i tipus

A la Taula 1 es resumeixen els diferents fenotips i molècules expressades en els IEL de ratolí, en comparació amb cèl·lules d'un òrgan perifèric com la melsa.

Taula 1

Propietats fenotípiques i funcionals dels IEL d'intestí prim i limfòcits T derivats de la melsa. Es mostra el percentatge de cèl·lules positives pel marcatge fluorescent amb AcMo per a cada antígen o la propietat funcional específica. Adaptada de Sydora i col. (1996).

	Limfòcits T esplènics	IEL d'intestí prim
TCR $\alpha\beta$	>95%	50-60%
TCR $\gamma\delta$	<5%	40-50%
Proporció CD4/CD8	2.5 - 3%	0.1%
Homodimers CD8 $\alpha\alpha$	No detectables	TCR $\gamma\delta$: 90% TCR $\alpha\beta$: 30-50%
DP (CD4+CD8+)	No detectables	Variable 4-30%
CD28	>95%	TCR $\gamma\delta$: no detectable TCR $\alpha\beta$: 50-70%
CD2	>95%	10-20%
Thy1	>95%	40-50%
CD69	<5%	90%
CD62L (Selectina L)	90%	<5%
$\alpha\epsilon\beta_7$	<5%	80-90%
P150,95	<5%	>90%
CD5	80%	TCR $\gamma\delta$: no detectable TCR $\alpha\beta$: 50-70%
CD45RB ^{high}	CD4+ CD8+	<5% 90%
Activitat citolítica basal	Absent	Present
Activitat MAP-K	Absent	Present
Proliferació en resposta a l'estimulació del TCR	Vigorosa	Limitada

Una diferència important entre els IEL i la resta de limfòcits sistèmics radica en la composició de les diferents poblacions que els formen. Gairebé tots els IEL són limfòcits T $\alpha\beta$, mentre que en melsa, sang perifèrica i ganglis limfàtics els limfòcits T pertanyen a dos grups majoritaris (limfòcits T CD4+TCR $\alpha\beta$ + restringits per MHC-II i limfòcits T CD8+TCR $\alpha\beta$ + restringits per MHC-I), més del 80% dels IEL d'intestí prim pertanyen al fenotip CD8+ i només un 5-10% presenten el fenotip CD4+ (Janossy i col., 1980; Selby i col., 1981; Cerf Bensussan i col., 1983; Hirata i col., 1986).

Una gran proporció de IEL CD8+ d'intestí prim expressen una única forma de CD8, l'homodímer CD8 $\alpha\alpha$, una forma pràcticament absent en la circulació sanguínia i la resta de compartiments sistèmics, que expressen l'heterodímer CD8 $\alpha\beta$ (Goodman i col., 1989; Jarry i col., 1990).

A més a més de la baixa presència de cèl·lules T CD4+ en el compartiment intraepitelial, moltes d'elles expressen també l'homodímer α de la molècula CD8 (Lefrancois 1991; Takimoto i col., 1992; Kearsey i col., 1996). Aquest fenotip de cèl·lules CD4+CD8+ "doble positives" (DP) no es troba en la circulació sistèmica.

D'altra banda, limfòcits "doble negatius" (DN) CD4-CD8-, que també són estranys en la circulació sistèmica, poden representar més del 10% dels IEL d'intestí prim (Itohara i col., 1989).

En el compartiment de IEL, el nombre de cèl·lules TCR $\gamma\delta$ + és superior al trobat en la circulació sanguínia (Klein i col., 1993). Per exemple, a l'ésser humà adult, la proporció de cèl·lules TCR $\gamma\delta$ + és aproximadament d'un 10%, encara que presenta un ampli rang de variació interindividual (Cerf-Bensussan i col., 1987; Spencer i col., 1989; Jarry i col., 1990; Viney i col., 1990). Aquesta proporció incrementa fins a valors superiors al 35% en els IEL d'intestí prim murí, els quals presenten una gran heterogeneïtat i un repertori de TCR específic del compartiment (Hayday 2000).

També hi ha d'altres marcadors de superfície que distingeixen els IEL d'altres limfòcits perifèrics. En aquest sentit, els IEL presenten molècules d'activació (CD69, CD25) (Lefrancois i col., 1989; Camerini i col., 1993), proteïnes de superfície involucrades en l'adhesió cel·lular (CD2, CD28) (Van Houtten i col., 1993; Gelfanov i col., 1995), proteïnes involucrades en el *homing* (CD62L) (Camerini i col., 1993) i marcadors de maduració (HAS, IL-7R, IL-2R β , Thy-1) (Moore i col., 1996; Suzuki i col., 1997).

S'ha identificat la proteïna HML-1 (CD103) que s'expressa en cèl·lules T activades de la mucosa intestinal. Concretament, s'expressa en més del 90% dels IEL humans intestinals i al voltant d'un 40% dels LPL (Kilshaw i col., 1990; Schieferdecker i col., 1990). HML-1 s'ha identificat com la integrina $\alpha\text{E}\beta\text{7}$, molècula implicada en l'adhesió dels limfòcits a les

cèl·lules de l'epiteli intestinal (Lefrancois 1999). Aquest marcador constitueix un element específic per a la identificació de IEL tant a nivell humà com murí.

Cal afegir que el compartiment intraepitelial presenta una elevada proporció de cèl·lules assassines naturals o *natural killer* (NK) de major complexitat evolutiva i fenotípica que els seus homòlegs en compartiments sistèmics i amb una funcionalitat encara per determinar (Helgeland i col., 1997; Todd i col., 1999).

A més a més de la particularitat de les poblacions limfocítiques en l'epiteli intestinal, cal destacar que, en diverses espècies, les proporcions dels diferents fenotips varien en comparar intestí prim i gros, part apical de les vellositats respecte la basal, o part proximal de l'intestí respecte l'extrem distal d'aquest (Beagley i col., 1995; Lundqvist i col., 1995; Camerini i col., 2001). La diferència més notable entre els IEL d'intestí prim i de còlon és la baixa proporció de limfòcits T $CD8\alpha\alpha+$ i amb $TCR\gamma\delta$ presents a l'intestí gros (Boll i col., 1995).

L'heterogeneïtat i variabilitat dels IEL entre els diferents compartiments i localitzacions ha dificultat la seva classificació que s'ha intentat fer en base a diferents criteris com presència de grànuls, capacitat citolítica, determinants antigènics, resposta enfront l'antigen, funcions protectores, influència tímica en el seu desenvolupament, etc. Actualment s'accepta la classificació dels IEL en dos tipus cel·lulars: a i b (Taula 2) (Hayday 2001).

El tipus a inclou cèl·lules $TCR\alpha\beta+$ que reconeixen, principalment, antígens presentats en el context de les molècules MHC-I i MHC-II convencionals, i són similars als limfòcits de la circulació sistèmica. El tipus b inclou cèl·lules $TCR\alpha\beta+CD8\alpha\alpha+$ i $TCR\gamma\delta+$ capaces de respondre enfront antígens presentats per MHC no convencionals. La seva distribució varia enormement en els diferents compartiments del GALT.

1.3.1.3. Fenotip, origen i funció dels IEL de tipus a

Els IEL de tipus a són oligoclonals, amb un repertori d'uns 250 clons, amb nombroses reordenacions en els gens codificants per TCR, de forma similar als LPL i als blasts $CD8+$ del conducte toràcic (Arstila i col., 2000). Els IEL de tipus a constitueixen les cèl·lules predominants en l'intestí gros murí (Beagley i col., 1998).

Els IEL de tipus a presenten funcions protectores, ja que inclouen cèl·lules citolítiques de fenotip $CD8\alpha\beta+TCR\alpha\beta+$ que, després del contacte amb l'antigen en sang perifèrica, es disseminen ràpidament cap a diferents localitzacions anatòmiques, incloent intestí (Masopust i col., 2001a i b). La mobilització d'aquests limfòcits cap al compartiment intestinal està dirigida per l'expressió de la integrina $\alpha_E\beta_7$, la qual reconeix específicament

MadCAM i la molècula d'adhesió E-cadherina (Buzoni-Gatel i col., 1999). En comparació a cèl·lules memòria esplèniques, els IEL tipus a poden ser activats ràpidament i, enfront d'una reinfecció, induir una resposta citolítica immediata mediada per citocines (Masopust i col., 2001a i b).

Els IEL tipus a són dependents del timus per al seu desenvolupament i per això, anteriorment se'ls anomenava "TD-IEL" (de timus-dependent). En ratolins sans, els IEL tipus a representen un 40% en relació al nombre total de IEL, i són absents en ratolins atímics. (Rocha i col., 1994).

Taula 2

Classificació proposada pels IEL (Hayday i col., 2001).

Propietat	Tipus a		Tipus b	
	TCR $\alpha\beta$ +CD8 $\alpha\beta$ +	TCR $\alpha\beta$ +CD8 $\alpha\alpha$ +	TCR $\gamma\delta$ +CD8 $\alpha\alpha$ +	TCR $\gamma\delta$ + DN
Expressió gènica	CD2	++	-	-
	CD3	++	+/-	+/-
	CD28	++	-	-
	CTLA4	++	-	-
	Ly6c	++	+/-	+/-
	Tactile	+/-	++	++
	FC ϵ R1 γ	-	++	++
	OCIL	+/-	++	++
	Ly49E	-	++	++
Solapament en l'ús del gen de la cadena TCR β amb la LP i conducte toràcic	++	-	-	-
Restricció per MHC convencionals	++	-	-	-
Presentes en ratolins:	TAP-/-	-	+/-	+/-
	Atímics	-	+	+
	Glicoproteïna-P -/-	Incrementada	Reduïda	Reduïda
	c-Kit -/-	++	+/-	+/-
Reconstitució mitjançant nòduls limfàtics perifèrics	++	++	+/-	+/-
Memòria immunològica de la infecció	++	++	-	-

1.3.1.4. Fenotip, origen i funció del IEL tipus b

Els IEL de tipus b són $CD8\alpha\alpha+TCR\gamma\delta+$ o $CD8\alpha\alpha+TCR\alpha\beta+$. No es troben en circulació limfàtica i el repertori de $TCR\gamma\delta$ presenta poc solapament amb els limfòcits perifèrics (Deusch i col., 1991; Hayday i col., 2000).

Tot i que els IEL de tipus b semblen molt heterogenis (Taula 2), comparteixen moltes característiques "no convencionals" que els diferencien dels de tipus a. De fet, a títol d'exemple, un estudi recent que compara el perfil gènic dels IEL $CD8\alpha\alpha+TCR\gamma\delta+$ amb els $CD8\alpha\alpha+TCR\alpha\beta+$, mostra que no hi ha cap altre marcador, excepte el propi TCR, que permeti distingir una població de l'altra (Pennington i col., 2003).

A l'igual que els IEL tipus a, els de tipus b són citolítics i secreten citocines i quimiocines (Chardes i col., 1994; Lundqvist i col., 1996). Aquest subtipus de IEL presenta un desenvolupament menys evident enfront d'antígens alimentaris o procedents de microorganismes i hi ha poques evidències de que posseeixin memòria immunològica (Smith i col., 2000).

Si l'antigen és presentat per cèl·lules epitelials, donat que l'epiteli no pot oferir la mateixa diversitat de trobades que els ganglis limfàtics, el desenvolupament dels IEL tipus b requereix una potenciació superior en el reconeixement antigènic. Així s'ha proposat que podrien ser autoreactius i que utilitzarien TCR invariants o semiinvariants que reconeixien molècules pròpies induïdes per infeccions o transformacions cel·lulars, de forma independent de l'epítot de l'antigen forani (Rocha i col., 1992).

Els IEL tipus b existeixen en animals atímics i per això es van classificar com a timus-independent, amb possible origen a les "criptoplaques" associades a intestí (Kanamori i col., 1996, Suzuki i col., 2000).

Tot i que encara no s'ha clarificat la identitat ni la natura (proteica o no proteica) dels putatius autoantígens involucrats en els IEL de tipus b, s'ha demostrat la implicació de les molècules MHC no clàssiques de classe IB. En aquest sentit, s'ha trobat que l'antigen *thymic leukemia* (TL), exemple de molècula MHC-I no clàssica intensament expressada i de forma exclusiva en les cèl·lules epitelials (Hershberg i col., 1990; Crowley i col., 2000), s'uneix preferiblement a la forma homotípica de CD8, és a dir a limfòcits $CD8\alpha\alpha+$. Mitjançant l'ús de tetràmers de TL s'ha evidenciat la possible existència de receptors específics per a aquest antigen (Tsujimura i col., 2001), i s'ha postulat que la unió TL- $CD8\alpha\alpha$ de gran afinitat pot modificar la resposta mediada per altres antígens presentats per molècules MHC clàssiques, fet que implicaria un nou mecanisme de regulació limfocítica: adaptació *versus* proliferació o citotoxicitat (Leishman i col., 2001).

1.3.1.5. Propietats funcionals generals dels IEL

Els IEL són cèl·lules especialitzades, la funció dels quals encara no està completament definida. Els IEL poden contribuir en la defensa mucosal a nivell cel·lular -mitjançant un tipus inusual de reconeixement antigènic específic- en la supervivència de la integritat cel·lular epitelial i en la patogènesi de diverses malalties (Guy-Grand i col., 1978; Camerini i col., 1993; Helgeland i col., 1997). Els IEL juguen un paper crucial en la prevenció de la hipersensibilització a antigens luminals foranis, ja que és la primera part del sistema immunitari que entra en contacte amb aquests. En qualsevol cas, la seva funcionalitat està determinada per la capacitat citolítica, encara que el mecanisme efector exacte encara avui és incert o variable (Mowat i col., 1990; Cerf-Bensussan i col., 1991; Croitoru i col., 1992; Hayday i col., 2001).

Els IEL de tipus a són principalment citolítics, actuen mitjançant la secreció de grànuls enzimàtics, per potenciació de la via apoptòtica i secreten citocines de tipus Th1 (Taguchi i col., 1991; Barrett i col., 1992; Chardes i col., 1994; Lundqvist i col., 1996). En canvi, l'efecte inhibidor de l'activitat citotòxica i els efectes inhibitoris en la proliferació semblen estar restringits a la subpoblació de tipus b CD8 $\alpha\alpha$ +, principalment mitjançats, pel factor transformador de creixement TGF- β (Teitelbaum i col., 1996; Cummins i Thompson, 1997; Saurer i col., 2003). Aquesta citocina és el factor més important en el canvi d'isotip en les cèl·lules plasmàtiques productores d'IgA de la mucosa intestinal, i sembla jugar un paper protector crític en models d'inflamació intestinal (Powrie i col., 1996; Buzoni-Gatel i col., 1997;) possiblement mitjançant la inhibició de la proliferació de limfòcits T, de les funcions de les APC i de la producció de citocines pro-inflamatòries i quimiocines per part dels enteròcits (Takeguchi i col., 1998; Garelik i col., 2000)

La capacitat lítica dels IEL s'ha demostrat de forma més clara amb l'aplicació dels anticossos monoclonals anti-CD3 (Lefrancois i col., 1989) o anti-TCR (Goodman i col., 1989). Els IEL també presenten l'activitat citotòxica dels limfòcits T (CTL) clàssica encara que la seva freqüència sembla ser baixa (Ernst i col., 1986; Viney i col., 1990). A més a més, els IEL humans presenten activitat citolítica espontània dirigida contra certs tumors epitelials (Taunk i col., 1992).

In vitro, els IEL responen de forma feble a mitògens, al·loantigens o anticossos anti-CD3. En canvi, hi ha evidències de proliferació davant de l'estimulació amb anticossos anti-CD2 (Ebert i col., 1989). L'anticòs anti-HML1 potencia els efectes proliferatius d'activació amb anti-CD3 (Sarnacki i col., 1991), però fins i tot en presència de cèl·lules accessòries la capacitat proliferativa dels IEL és difícil de demostrar (Sim, 1995).

1.3.1.6. Origen i desenvolupament cel·lular dels IEL: dependència tímica versus criptoplaques

A diferència dels limfòcits T CD8 $\alpha\beta$ + que es desenvolupen en el timus, es troben distribuïts en els teixits limfoides perifèrics i en el cas de l'intestí constitueixen els IEL tipus a, els IEL de tipus b tenen un origen i desenvolupament totalment diferent (Oida i col., 2000; Hayday i col., 2001).

El desenvolupament de les cèl·lules T en el timus finalitza amb una d'aquestes tres situacions: selecció negativa dels clons autoreactius, selecció positiva comportant la supervivència dels timòcits i la seva migració cap a teixits perifèrics com intestí, o absència de selecció amb el resultat final de mort cel·lular programada (Robey i col., 1994).

En els últims anys, però, s'han acumulat evidències que indiquen que els IEL CD8 $\alpha\alpha$ + (tipus b) són capaços potencialment de desenvolupar-se en algun lloc de la mucosa intestinal sense necessitat de passar pel timus. En aquest sentit, la detecció, encara que dèbil, de mRNA de proteïnes activadores de la recombinació gènica (Rag-1 i Rag-2) (Guy Grand i col., 1992; Lin i col., 1994; Boll i col. 1995; Oida i col., 2000) i la identificació de la presència de cèl·lules limfoides amb propietats precursors de cèl·lules T (TCR-) (Guy Grand i col., 1991; Hamad i col., 1997; Mowat i col., 1997; Page i col., 1998) posen de manifest la noció que els precursors limfoides compromesos al llinatge T entren a l'epiteli i desenvolupen els passos necessaris en la reordenació gènica del TCR amb la subsegüent diferenciació a IEL madurs "in situ".

S'han identificat múltiples agregats minúsculs (\approx 1500) formats per més de mil cèl·lules progenitores de fenotip c-kit+ IL-7R+ Thy-1+, agrupades en les criptes de la làmina pròpia d'intestí prim i gros murí que s'han anomenat criptoplaques (CP) (Kanamori i col., 1996; Oida i col., 2000) (Figura 5). A més a més, estudis amb aquesta progènie han revelat que aquests són capaços de generar IEL TCR $\alpha\beta$ + i TCR $\gamma\delta$ + en ratolins immunodeficients SCID irradiats (Saito i col., 1998).

Aquestes troballes indiquen que les criptoplaques són claus com a localització extratímica on els precursors de cèl·lules T poden desenvolupar-se i madurar a IEL. S'han descrit almenys dos estats intermedis de desenvolupament en aquesta via extratímica, on els més immadurs resideixen a l'interior de les criptoplaques (Oida i col., 2000).

Encara queda per descriure com les cèl·lules progenitores limfo-hematopoètiques migren des de la medul·la òssia cap a les criptoplaques per diferenciar-se en IEL. Estudis recents demostren que la via implicada en el reconeixement de la quimiocina CCL25 (TECK)

mitjançant el seu receptor CCR9 és essencial per a la formació de criptoplaques i la consegüent aparició dels IEL (Onai i col., 2001).

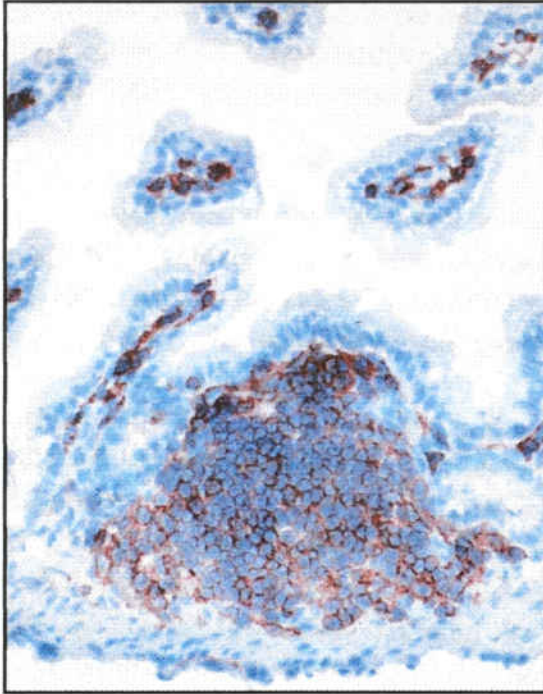


Figura 5

Fotografia en microscopi òptic (100X) d'una criptoplaqueta de ratolí. La preparació ha estat tenyida amb hematoxilina-eosina i marcada amb l'AcMo anti-CD45, que posa de manifest els agregats limfocítics. Imatge cedida per la Prof. Dra. Victoria Camerini (University of California, Irvine)

Cal destacar que les criptoplaques, encara que s'han estudiat més en humans, també s'han identificat en intestí prim de rata, on s'han anomenat "*lymphocyte filled villi*" (LFV) o "timus intestinal difús", ja que és la font de la població de IEL antigament coneguda com a timus independent en aquests animals (Mayrhofer i col., 1995; Mayrhofer i col., 1999).

1.3.2. LIMFÒCITS DE LÀMINA PRÒPIA (LPL)

1.3.2.1. Localització anatòmica dels LPL

Hi ha poca informació de les poblacions cel·lulars situades a la làmina pròpia intestinal en comparació amb tot l'estudi desenvolupat sobre els IEL. En qualsevol cas, la làmina pròpia presenta tanta heterogeneïtat cel·lular com la que es troba a l'epiteli intestinal. Aquesta població difusa comprèn diferents tipus cel·lulars: limfòcits B i cèl·lules plasmàtiques madures, les quals representen la meitat de les cèl·lules presents en aquest compartiment, limfòcits T que representen una tercera part i altres tipus cel·lulars com macròfags, cèl·lules dendrítiques, mastòcits i eosinòfils (Lee i col., 1988; Shanahan 1994)

1.3.2.2. Fenotip i funcions dels limfòcits B i de les cèl·lules plasmàtiques de làmina pròpia

Els limfòcits B confereixen una important defensa immunològica a nivell intestinal, ja que constitueixen la base del sistema secretor d'IgA i IgM (Brandtzaeg i col., 1999). Aquests limfòcits B finalitzen la seva diferenciació a cèl·lules plasmàtiques a la làmina pròpia. En aquest sentit, la làmina pròpia presenta limfòcits B en tots els seus estats madurats, des de blasts immadurs a cèl·lules plasmàtiques productores d'immunoglobulines.

Les cèl·lules de la línia B, disperses per la làmina pròpia, estan formades per una petita població de cèl·lules memòria definides pel fenotip $slgA+CD20+CD27+CD40+CD38^{low}CD45RA+$; una tercera part de cèl·lules $slgA+CD20-CD27+CD40-CD38^{high}$ que defineixen blasts d'arribada recent al teixit mucosal i, a més a més, les cèl·lules plasmàtiques, la majoria de les quals presenten absència d'aquests marcadors (Farstad i col., 2000).

La diferenciació dels limfòcits B en cèl·lules memòria/efectores es produeix després del contacte amb l'antigen, i es manifesta amb canvis en el fenotip i la morfologia. Concretament, en comparació amb els de sang perifèrica, els limfòcits B de làmina pròpia es troben en un cert estat d'activació, ja que presenten un increment en l'expressió de marcadors d'activació i secreció espontània d'immunoglobulines (Van der Heijden i col., 1987; Peters i col., 1989). Així, més del 80% dels limfòcits B activats de tot l'organisme estan localitzats a l'intestí, sobre tot a la làmina pròpia. Per tant, en base a resultats obtinguts en ratolins, es pot dir que la làmina pròpia funciona com a teixit efector i inductiu de la resposta immunitària (Brandtzaeg i col., 2001; Fagarasan i col., 2001).

Les cèl·lules B verges normalment canvien l'isotip de la immunoglobulina de superfície (slg) des de $slgD+slgM+$ a $slgD-slgM+$ i, després d'una segona estimulació, segueixen la seva maduració cap a un altre fenotip, normalment IgG o IgA. La slg queda retinguda quan la cèl·lula entra en el procés de convertir-se en cèl·lula memòria, però es va perdent gradualment durant la fase terminal de diferenciació a cèl·lula plasmàtica, així com succeeix amb altres marcadors de superfície (Banchereau i col., 1992). La presència d'un determinat microambient en els llocs inductors mucosals, fa que limfòcits $slgM+$ immadurs, madurin preferentment cap a cèl·lules $slgA+$ (Kelsall i col., 1999), que seran les responsables de la producció de la IgA polimèrica, principal arma humoral de les superfícies mucoses (Lamm, 1998). Així, les cèl·lules B de la làmina pròpia produeixen IgA polimèrica, principalment en forma de dímer, i representen la progènie derivada de cèl·lules procedents de plaques de Peyer i d'altres agregats limfàtics (Farstad i col., 2000).

1.3.2.3. Fenotip i funcions dels limfòcits T de làmina pròpia

En humans, en aquest compartiment existeixen tant cèl·lules CD4+ com CD8+ en proporcions similars a sang perifèrica (Zeitz i col., 1991) i, a diferència dels IEL, el receptor per a l'antigen en gairebé totes les cèl·lules T intestinals de la làmina pròpia és TCR $\alpha\beta$ (Jarry i col., 1990). Els LPL T CD4+ representen un 30% (Hayday i col., 2001) i els LPL T CD8+ presenten un rang variable que va del 15 al 54%; existeix una població significativa (4-26%) de limfòcits T DP (CD4+CD8 α +CD8 β -) i una baixa proporció de limfòcits T $\gamma\delta$ + i absència de cèl·lules NK (CD56+) (Boll i col., 1995; Abuzakouk i col., 2001). Els limfòcits T humans de la LP presenten característiques de cèl·lules memòria, amb baixos percentatges de CD45RA i elevats percentatges de CD45RO i CD58 (Schieferdecker i col., 1992).

En el cas dels rosegadors, els limfòcits T (caracteritzats per la presència de la molècula CD3) representen un 40% i, a l'igual que a l'home, són majoritàriament TCR $\alpha\beta$ + (85%), 15-20% de limfòcits DN i proporcions de limfòcits CD4+ i CD8+ semblants (40%), i més de la meitat d'aquests últims presenten l'heterodímer CD8 $\alpha\beta$, amb expressió de CD2 i CD28 (Boll i col., 1995; Manzano i col., 2002). També s'han descrit una baixa proporció de cèl·lules NK i limfòcits TCR $\gamma\delta$ + en aquest compartiment (Tagliabue i col., 1982; Tice, 1990;).

Els LPL i els IEL comparteixen algunes característiques com és el cas dels limfòcits que expressen la molècula CD8 $\alpha\alpha$, o CD8 $\alpha\beta$ amb un repertori oligoclonal, fenomen que també succeeix en el cas dels limfòcits T CD4+ (Arstila i col., 2000). A més a més, a l'igual que en el cas dels IEL, s'han descrit diferències fenotípiques entre LPL presents a l'intestí prim i a l'intestí gros (Boll i col., 1995).

La funció específica desenvolupada pels LPL encara no està establerta de forma clara, però se sap que poden generar respostes enfront de patògens entèrics i que estan involucrats en la regulació de la resposta immunitària per tal de controlar els antígens derivats de la ingesta i la flora microbiana (Zeitz i col., 1991).

2. ESTUDI DEL DESENVOLUPAMENT DEL GALT

2.1. DIFERÈNCIES EN L'ONTOGÈNIA DEL GALT ENTRE HUMANS I ROSEGADORS

Les superfícies mucoses representen la major part de la interfase entre el sistema immunitari de l'hoste i l'ambient extern. Per aquesta raó no és d'estranyar que sigui un sistema altament desenvolupat. Ara bé, una característica important del sistema immunitari mucosal és el seu estat de desenvolupament en el moment del naixement i la seva habilitat per generar una resposta immunitària efectiva quan el neonat troba patògens intestinals. En aquest sentit, en les últimes tres dècades, l'estudi de la immunitat mucosal en rosegadors, com rata i ratolí, ha facilitat aquest estudi.

El teixit limfoide associat a la mucosa dels rosegadors és similar a la d'altres mamífers: presenten cèl·lules plasmàtiques productores d'IgA a la làmina pròpia, limfòcits intraepiteliais i plaques de Peyer com a òrgans limfoïdes secundaris. A més a més, les plaques de Peyer en rata i ratolí són clarament visibles i accessibles per a l'experimentació. Tota la metodologia emprada avui en dia per a l'aïllament i estudi dels diferents compartiments immunitaris mucosals ha estat desenvolupada prèviament en rosegadors.

Cal destacar però, que hi ha diferències entre el GALT humà i el de rata o ratolí, i que es fa especialment evident durant l'ontogènia. Mentre que es pot considerar que el GALT humà és probablement funcionalment i histològicament madur entre les 19-20 setmanes de gestació, en el cas dels rosegadors la seva maduració és tardana i majoritàriament postnatal, fet que facilita l'estudi del seu desenvolupament (Mac Donald, 1990).

Tant en rata com en ratolí el període de gestació es troba al voltant de 21-22 dies (280 dies en humans) i aquestes espècies animals són deslletades a les 3 setmanes d'edat.

En el cas de l'ésser humà, la majoria de les estructures que formen part del GALT es desenvolupen durant la vida fetal (Brandtzaeg 1998), ara bé, l'activació limfocítica i la secreció d'IgA no apareixen fins després del naixement (Gebbers et al., 1990; Brandtzaeg et al., 1991). S'ha observat que la migració de IEL a l'epiteli es produeix parcialment durant el període gestacional, però l'estimulació luminal durant els primers mesos de vida incrementa el seu nombre fins a deu vegades (Machado et al., 1994). Aquesta activació antigènica és progressiva durant la infància, tot començant des de les primeres setmanes de vida, i reflectint la presència de nous antigens en aquest compartiment immunitari: antigens alimentaris i procedents de la microbiota intestinal (Cummins et al., 1997).

En el desenvolupament del GALT en rata o ratolí, majoritàriament postnatal, l'estimulació luminal juga un paper molt destacat. En aquest sentit, cal destacar que durant el primer mes de vida, la dieta i la flora microbiana del tracte gastrointestinal dels rosegadors presenta grans canvis i sens dubte les proteïnes de la dieta (llet i menjar sòlid) i de la microflora desenvolupa un important paper fisiològic en la maduració del GALT (da Silva i col., 2003). Durant els primers 10 dies, l'únic menjar que reben els animals nadons és la llet materna. Des del dia 10 al dia 21 (deslletament), els cadells continuen lactant però també ingereixen dieta sòlida. Després del deslletament mengen pinso estàndard de laboratori. Durant tot aquest període també hi ha grans canvis en la flora bacteriana (Savage 1979).

2.2. FACTORS INFLUENTS EN EL DESENVOLUPAMENT DEL GALT

La maduració del GALT està influïda pel contacte antigènic amb materials foranis, bacterians o alimentaris, procés que té lloc principalment a la mucosa intestinal. Encara que aquest és el principal factor influent en el desenvolupament del GALT, un altre factor també important en el desenvolupament dirigit per l'antigen a l'intestí és l'estat maduratiu de les cèl·lules encarregades de presentar-lo. En aquest sentit, s'ha suggerit que els neonats no són capaços d'estimular de forma efectiva als limfòcits (Macatonia i col., 1995; Muthukkumar i col., 2000)

2.2.1. MICROBIOTA INTESTINAL

Els bacteris aerobis colonitzen el tracte gastrointestinal humà durant les primeres 24h després del naixement; el segon dia apareixen coliforms, lactobacils i enterococs, altres anaerobis s'estableixen el tercer dia donat que els aerobis han facilitat l'ambient. El cinquè dia, s'estableixen bifidobacteris i, cap a la segona setmana, apareixen Grampositius (Gracey 1993).

L'avenç en la tecnologia gnotobiòtica al voltant dels anys 1950 ha permès l'estudi exhaustiu dels efectes de la flora intestinal en intestí de l'animal experimentació. Els resultats en aquests animals, lliures de patògens, mostren una disminució dràstica del GALT: les cèl·lules plasmàtiques són pràcticament nul·les a la làmina pròpia i les plaques de Peyer són molt petites (Gordon et al., 1961; Wostmann 1996). Posteriorment s'ha confirmat que el nombre de cèl·lules plasmàtiques productores d'IgA es redueix unes deu vegades (Crabbe 1968) i en el nombre de IEL de 2 a 4 vegades (Glaister 1973; Bandeira et al., 1990).

En el cas de la rata, s'han trobat microorganismes Gram-positius en el jejú pràcticament durant tot el període de lactància (fins l'edat de 18 dies), i posteriorment apareixen Gram-negatius i llevats (Cummins et al., 1988).

Els tractes gastrointestinals de ratolins lactants de determinades colònies lliures de patògens es colonitzen amb una seqüència particular amb diversos tipus de bacteris, de forma que coliforms i enterococs colonitzen intestí gros als 7-9 dies (Davis et al., 1973). Els canvis en la colonització bacteriana de l'intestí després del deslletament han demostrat una gran influència en l'aparició de cèl·lules secretores d'IgA en la làmina pròpia intestinal (Moreau et al., 1982).

Cal destacar que, en humans, els organismes Gram-positius predominen principalment a la part proximal de l'intestí prim mentre que els organismes Gram-negatius apareixen a la part distal de l'ili i colon (Cummins et al., 1997). La majoria del GALT es troba localitzat a intestí prim, mentre que la microbiota es concentra al intestí gros; la participació de la flora bacteriana humana en activació luminal del GALT d'intestí prim és clarament menor que la participació dels antígens alimentaris (da Silva et al., 2003).

2.2.2. ANTÍGENS ALIMENTARIS

Tot i que la majoria de macromolècules de la dieta es degraden en el moment que arriben a l'intestí prim, algunes d'aquestes proteïnes romanen parcialment degradades o intactes i són absorbides cap al torrent sanguini (Husby et al., 1985; Bruce et al., 1987).

La influència immunitària de les proteïnes de la dieta, com a estímuls luminals, està també justificada per la coincidència del gran desenvolupament del GALT i la predominant absorció alimentària en el mateix espai físic que és l'intestí prim.

Durant l'etapa de deslletament en humans, hi ha un increment progressiu en l'exposició a proteïnes alimentàries, començant per les proteïnes de l'arròs i vegetals, antígens presents en la fruita i, més tard, ovoalbúmina de pollastre i altres proteïnes de l'ou, gluten, llet de vaca i proteïnes càrniques al voltant de 6-12 mesos d'edat abans de una diversificació més gran en el menjar. La diversitat de les proteïnes alimentàries incrementen exponencialment durant i al final del període d'alletament amb cada nou aliment introduït (da Silva et al., 2003).

3. RATOLINS TRANSGÈNICS AMB TCR H-Y

En aquest treball s'han utilitzat ratolins transgènics de la soca C57BL/10 Rag2^{-/-} TCR H-Y (H-2D^{b/b}) que s'obtenen a partir de l'encreuament de ratolins Rag2^{-/-} amb ratolins transgènics per al TCR H-Y. Aquest model permet l'estudi d'un tipus específic de limfòcits T CD8+, els quals expressen un TCR dirigit contra un pèptid que només es troba en mascles (Smcy-3) i que és presentat per la molècula MHC de classe I H-2D^b (Kisielow et al., 1988; Bluthmann et al., 1989; Teh et al., 1989, Cruz et al., 1998; Markiewickz 1998).

Els ratolins *knock-out* Rag2^{-/-} són animals deficients en el gen Rag2. Els ratolins homozigots per Rag2^{-/-} no són capaços d'iniciar la reordenació gènica V(D)J, el que comporta el dèficit total de generació de limfòcits T o B madurs, encara que presenten una hematopoesi aparentment normal. Aquests animals pateixen una immunodeficiència combinada greu (Shinkai et al., 1992; Schulz et al., 1996). Aquest model s'utilitza en el desenvolupament de vacunes, estudis de trasplantaments, recerca hematopoètica i, principalment, per a l'obtenció de nous models animals a partir del seu encreuament amb ratolins transgènics, que només presentaran limfòcits específics per al transgen.

Els animals transgènics per a un TCR específic permeten, entre d'altres, l'estudi de TCR individuals, ja que se simplifica la policlonalitat dels possibles TCR. En aquest treball, s'ha partit d'animals C57BL/10 TCR H-Y (H-2D^{b/b}) que expressen un TCR transgènic, anomenat TCR H-Y, dirigit específicament contra el pèptid Smcy-3 amb el qual s'uneix amb alta afinitat. Aquest epítot forma part d'una proteïna codificada en el cromosoma Y i implicada en l'espermatogènesi; per tant, només està present, àmpliament distribuïda, en els ratolins mascles. A més a més, aquests animals només presenten el MHC específic de classe I H-2D^b i no tenen MHC de classe II, per tant hi ha una restricció en la selecció tímica dirigida cap a les cèl·lules CD8+, mentre que els limfòcits CD4+ són absents. Aquest MHC de classe I presentarà de forma efectiva el pèptid Smcy-3 als limfòcits T CD8+ amb el TCR transgènic.

L'encreuament dels ratolins de la soca C57BL/10 Rag2^{-/-} (H-2D^{b/b}) amb els ratolins transgènics C57BL/10 TCR H-Y (H-2D^{b/b}) origina una progènie d'animals que només presenta limfòcits T CD8+ amb el TCR transgènic anomenada C57BL/10 Rag2^{-/-} TCR H-Y (H-2D^{b/b}), citada a partir d'ara TCR H-Y. Donat que el pèptid reconegut pel TCR només es troba en mascles, aquest model té un comportament diferent en mascles que en femelles (Taula 3 i Figura 6).

Taula 3:

Manifestacions diferencials entre mascle i femella TCR H-Y en funció de la presència o absència de l'antigen Smcy. Modificat de Cruz i col.(1998).

PÈPTID	FEMELLA		MASCLE	
	desconegut (baixa afinitat)		agonista (Smcy-3) (alta afinitat)	
TIMUS	selecció positiva		selecció negativa	
MELSA	molts	CD8 $\alpha\beta$ +	pocs	CD8-
IEL	pocs	CD8-	molts	CD8 $\alpha\alpha$ +

En els ratolins mascles d'aquest model, l'epiteli tímic presenta, entre d'altres, l'epítip Smcy-3 als limfòcits CD4+CD8+ (DP). Com que tots ells contenen el TCR d'alta afinitat per aquest autoantigen (pèptid agonista), les cèl·lules T CD8+ autoreactives són seleccionades negativament i per tant delecionades. La manifestació perifèrica esperada d'aquest procés de selecció negativa seria l'absència virtual de limfòcits T CD8+ (Teh i col., 1989; Kisielow i col., 1988; von Boehmer i col., 1991). Malgrat el procés de selecció negativa i delecio del llinatge cel·lular CD8 $\alpha\beta$ + en el timus dels ratolins mascles, existeix sorprenentment una gran població de limfòcits T CD8 $\alpha\alpha$ + a nivell intraepitelial intestinal (Figura 6) (Rocha i col., 1992; Poussier i col., 1993; Cruz i col., 1998).

Aquest fet ha permès postular que els IEL CD8 $\alpha\alpha$ + derivarien de cèl·lules T CD8 $\alpha\beta$ + que, tot i trobar-se amb el lligand agonista, escaparien de la delecio tímica i sobreviurien a la perifèria mitjançant la disminució en el nivell d'expressió de la molècula CD8 (CD8^{low}) o per la pèrdua total de CD8 (CD8-). Així, els limfòcits T CD8^{low} o CD8- generats d'aquesta forma serien els precursors dels IEL CD8 $\alpha\alpha$ + (Cruz i col., 1998).

En el cas dels ratolins femelles TCR H-Y, el timus és capaç de seleccionar de forma positiva el llinatge de limfòcits CD8+ mitjançant la interacció del TCR H-Y amb antigens propis de baixa afinitat, ja que les femelles no presenten, òbviament, l'epítip específic per a aquest TCR. Conseqüentment, els seus òrgans limfoides perifèrics, com la melsa, presenten una gran població de limfòcits T CD8 $\alpha\beta$ +. En aquests animals, però, al contrari dels mascles, el nombre de limfòcits és molt baix a l'epiteli intestinal i majoritàriament no expressen la molècula CD8 a la seva superfície (CD8-) (Figura 6). Tots aquests fets concorden amb la hipòtesi que en absència de selecció negativa al timus no hi hauria generació eficient de IEL CD8 $\alpha\alpha$ + (Cruz i col., 1998).

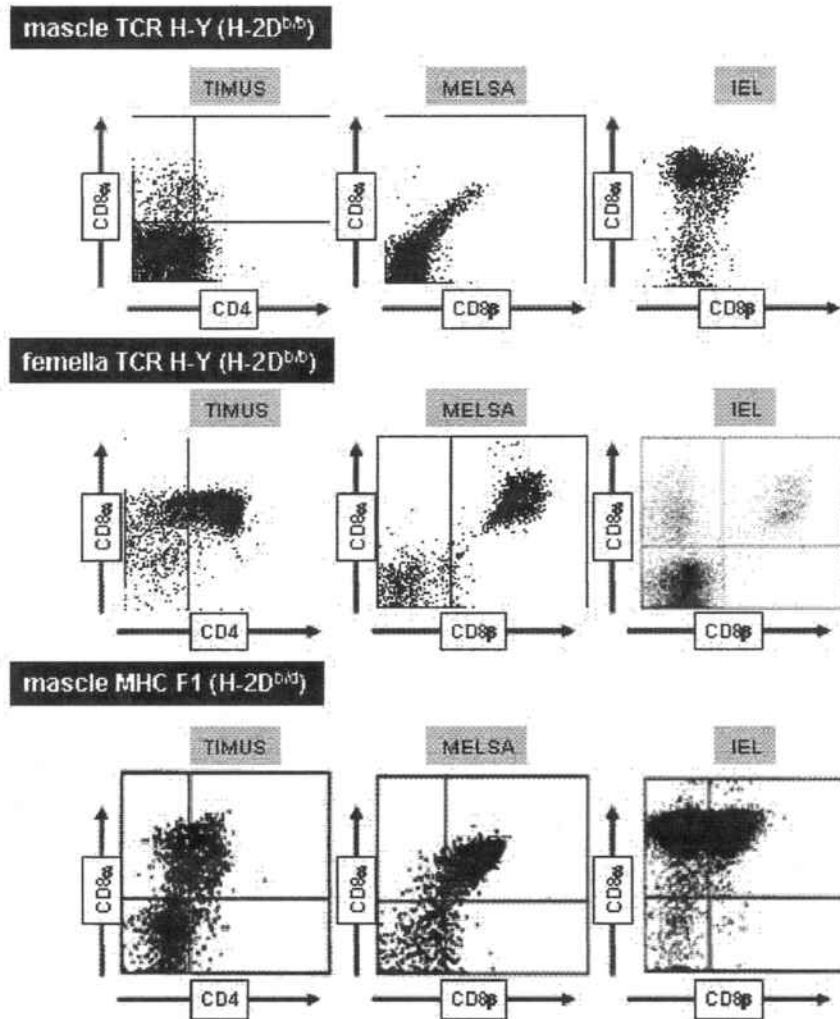


Figura 6

Citogrames biparamètrics de les poblacions limfocítiques del timus, melsa i IEL en mascles i femelles TCR H-Y i mascles MHC F1. Tots els diagrames representatius mostren l'expressió de CD8 α /CD8 β per melsa i IEL o CD8 α /CD4 en el timus en limfòcits que expressen el transgen H-Y, mitjançant la selecció de la finestra d'adquisició d'aquelles cèl·lules marcades amb un anticòs específic, T3.70.

Recentment, s'ha descrit un nou model transgènic heterozigot per al MHC de classe I obtingut a partir de l'encreuament entre animals TCR H-Y i ratolins B10.D2 Rag2 $^{-/-}$ que expressen el MHC de classe I H-2D d (Podd i col., 2001). Aquests ratolins són anomenats MHC F1 (H-2D $^{b/d}$). En els ratolins mascles MHC F1, de forma similar a la femella TCR H-Y, el timus presenta limfòcits T CD8 $^{+}$ i cèl·lules DP i la melsa conté limfòcits T CD8 $^{+}$. A diferència de la femella TCR H-Y, l'epiteli intestinal dels mascles MHC-F1 presenta cèl·lules CD8 $^{+}$ amb proporcions similars de limfòcits T CD8 $\alpha\alpha^{+}$ i T CD8 $\alpha\beta^{+}$ (Figura 6) (Podd i col., 2001).



MATERIAL I MÈTODES



1. ANIMALS

1.1. RATES LEWIS

Per a l'estudi de IEL i LPL durant el període de lactància s'ha utilitzat rates lactants Lewis, mascles i femelles, d'edats compreses entre 1 i 21 dies de vida. Com a animals de referència s'han emprat rates adultes Lewis mascles de 10 setmanes d'edat. Les rates Lewis gestants (G14) i les rates Lewis mascles de 10 setmanes d'edat han estat subministrades per Harlan (Barcelona). Les rates gestants s'han distribuït en gàbies individuals en condicions controlades de temperatura i humitat i amb un cicle 12 h:12 h llum:fosc a l'estabulari de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona. Els animals van ser observats diàriament fins al moment del part que va tenir lloc de forma natural. El dia del naixement va ser identificat com a dia 1. Les ventrades van ser unificades en 8 animals per mare, amb lliure accés a les mames i al pinso de rata. Les rates adultes de referència es van distribuir en gàbies amb quatre animals i van ser mantingudes en les mateixes condicions que les mares gestants. Totes les rates van disposar de pinso comercial i aigua *ad libitum*.

Els estudis s'han realitzat seguint les directrius institucionals per a la cura i ús d'animals de laboratori establertes pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona, i els procediments utilitzats han estat aprovats per aquest mateix comitè.

1.2. RATOLINS MODIFICATS GENÈTICAMENT

Els ratolins adults (mascles i femelles) utilitzats per a la generació de les diferents progènies específiques a estudiar han estat subministrats per Taconic Farms (San Diego) i s'han mantingut a l'estabulari de la Facultat de Biociències de la Universitat de Califòrnia-Irvine en condicions controlades de temperatura i humitat i amb un cicle 12 h:12 h llum:fosc. A més a més, l'estat immunocompromès (deficiència de limfòcits T i B) que presenten aquests ratolins modificats genèticament, aquests es van disposar en gàbies adaptades amb un dispositiu de flux laminar d'aire que actua com a barrera específica i origina un ambient lliure de patògens, i el pinso comercial i l'aigua de beguda que van rebre van ser prèviament autoclavats.

Per a l'estudi sobre el desenvolupament de IEL durant les primeres setmanes de vida s'han utilitzat ratolins transgènics mascles amb TCR H-Y: homozigots per al MHC (H-2D^{b/b}) i heterozigots o MHC F1 (H-2D^{b/d}). Per a l'obtenció de ratolins TCR H-Y (C57BL/10 Rag2^{-/-} TCR H-Y) s'ha realitzat l'encreuament entre mascles i femelles del mateix tipus. Per tal d'obtenir ratolins MHC F1 (Rag2^{-/-} TCR H-Y; H-2D^{b/d}), s'ha partit de ratolins C57BL/10 Rag2^{-/-} TCR H-Y; H-2D^{b/b} i ratolins B10.D2 Rag2^{-/-}; H-2D^{d/d}, mascles i femelles indistintament.

Per tal d'estudiar la dependència de la presència tímica de l'antigen agonista s'han utilitzat ratolins doblement transgènics Smcy TCR H-Y (C57BL/10 Rag2^{-/-} Smcy TCR H-Y). Aquests animals es van generar a l'estabulari de la Universitat de Califòrnia-Irvine a partir de la línia simple transgènica Smcy creada a La Jolla Institute (San Diego) i mitjançant encreuament amb ratolins C57BL/10 Rag2^{-/-}, i el posterior encreuament amb ratolins transgènics TCR H-Y (ambdós facilitats per Taconic Farms) tal i com es detalla a l'apartat 8.2. de Material i mètodes.

En tots els encreuaments realitzats, mascle i femella van conviure durant 14 dies, moment en el qual es retira el mascle de la gàbia. Les femelles gestants van ser observades de forma diària fins al moment del part, que va tenir lloc de forma natural. El dia del naixement va ser identificat com a dia 1. Les ventrades van disposar de lliure accés a les mames i al pinso. Als 21 dies de vida es va realitzar el procés de deslletament dels animals, distribuïnt-los en noves gàbies, separats de la mare.

L'accés a l'habitable on es troben tots aquests animals immunocompromesos ha requerit la utilització de bata, polaines, guants i mascareta d'un sol ús. Totes les manipulacions d'aquests animals (encreuaments, seccionar porcions de cues, marcar i sexar els animals) s'han realitzat sota campana de flux laminar, segons els protocols i procediments aprovats pel Comitè Institucional per a la cura i ús d'animals de laboratori de la Universitat de Califòrnia, Irvine.

2. DISSENYES EXPERIMENTALS

2.1 ESTUDI DE L'ONTOGÈNIA DE IEL I LPL DE RATES LEWIS DURANT EL PERÍODE DE LACTÀNCIA

Per aquest estudi, es va dissenyar el protocol experimental esquematitzat a la **Figura 7**.

Es van utilitzar rates Lewis lactants a partir de les quals es van obtenir limfòcits (IEL i LPL) d'intestí prim des del dia de naixement (dia 1) i en diferents dies (3, 5, 7, 11, 14 i 21) durant el període de lactància. De forma paral·lela es va disposar de rates Lewis adultes com a grup de referència.

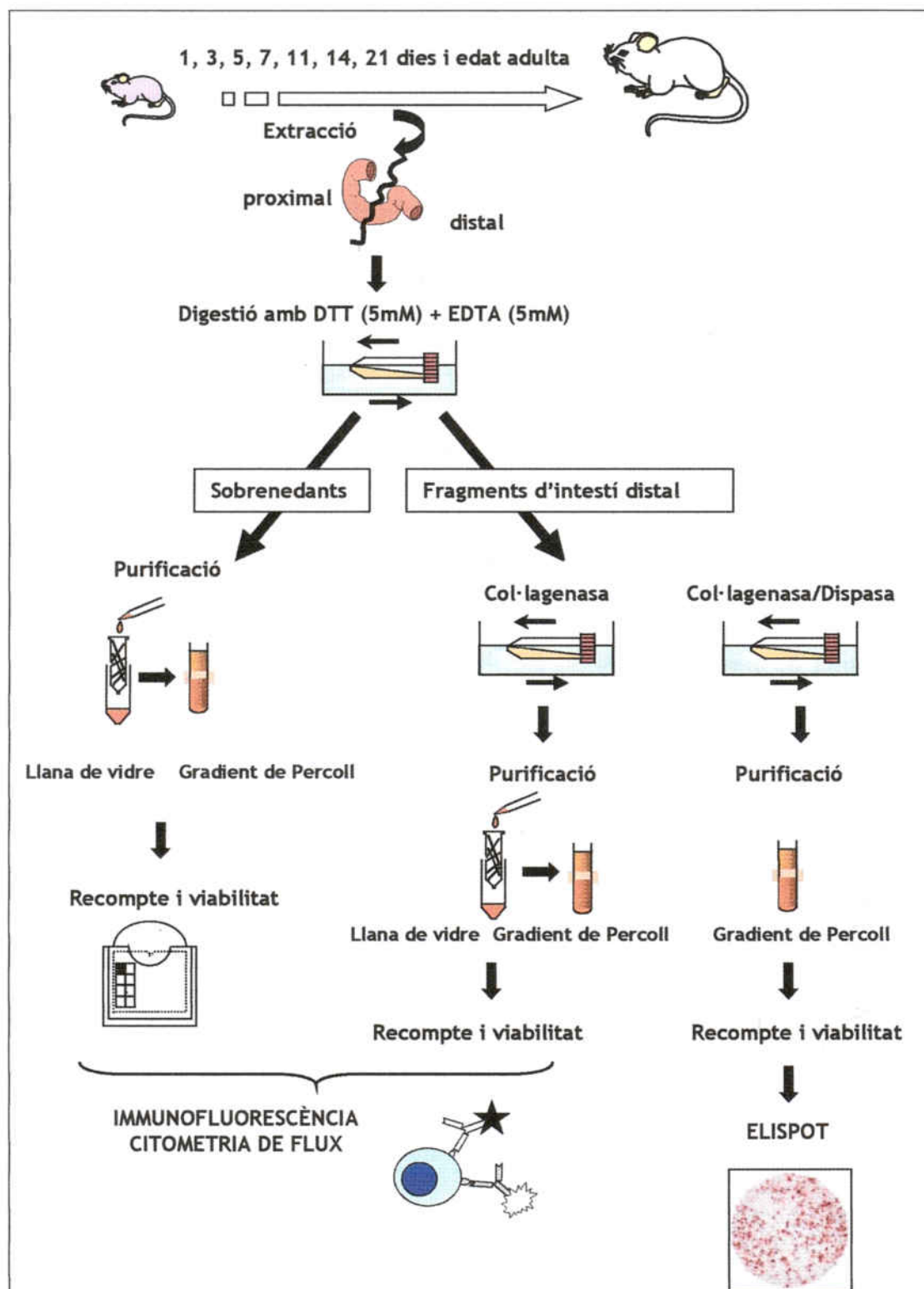
Les rates neonates van ser redistribuïdes en 8 animals per mare, immediatament després del naixement, i es van identificar de l'1-8 mitjançant marcatge individual. En cadascun dels animals es va realitzar diàriament el seguiment de la corba ponderal. Totes les manipulacions diàries dels animals (marcatge i pesada) es van dur a terme en el mateix interval horari per evitar la influència o modificació dels ritmes biològics.

Es va disposar de més d'una ventrada per dia ja que el rendiment d'obtenció de IEL i LPL en teixits molt joves no permetia l'estudi complet, en un mateix animal, de tots els fenotips considerats.

El dia de sacrifici es va extreure l'intestí prim i es va dividir en dues parts iguals que es van anomenar proximal i distal. D'aquestes dues porcions es va procedir a l'aïllament de IEL i posteriorment, de la part proximal, es van aïllar LPL. Després de fer el recompte i l'estudi de la viabilitat de les suspensions cel·lulars obtingudes, aquestes van ser immediatament processades per a l'estudi del fenotip cel·lular per tècniques d'immunofluorescència i posteriorment analitzades per citometria de flux. En determinats animals -establerts prèviament a l'atzar- es va procedir a l'obtenció de LPL per tal d'estudiar la seva capacitat secretora d'immunoglobulines per la tècnica d'ELISPOT.

Figura 7

Esquema del disseny experimental seguit per a l'estudi de l'ontogènia de IEL i LPL durant el període de lactància



2.2. ESTUDI DEL DESENVOLUPAMENT DE IEL CD8 $\alpha\alpha$ + EN RATOLINS TRANSGÈNICS AMB TCR H-Y

Per aquest estudi s'han seguit 3 dissenys experimentals que s'esquematitzen a la **Figura 8**.

En l'estudi de l'ontogènia de ratolins transgènics TCR H-Y i MHC F1 (**Figura 8A**), s'han utilitzat mascles joves de 2, 3, 4, 5 i 6 setmanes d'edat. El dia de sacrifici es va procedir a l'extracció de l'intestí prim, melsa i timus, per tal d'obtenir les poblacions limfocítiques corresponents. Per cada població cel·lular obtinguda, es va realitzar el recompte cel·lular i l'estudi de la viabilitat i es va procedir a l'establiment del fenotip limfocític per tècniques d'immunofluorescència i citometria de flux. Una sèrie d'animals, escollits a l'atzar, van rebre per via i.p. dues dosis de 100 μ mol en 100 μ L de PBS del pèptid antigènic Smcy-3 KCSRNRQYL (Markiewicz, 1998), pel qual és autoreactiu el TCR H-Y-. Aquestes dues administracions es van realitzar els dos dies previs a l'obtenció de IEL en ratolins de 2, 3 i 4 setmanes d'edat. Paral·lelament, es va disposar d'un grup de ratolins que van rebre AcMo anti-CD3 en PBS a raó de 50 μ g/20g de pes corporal.

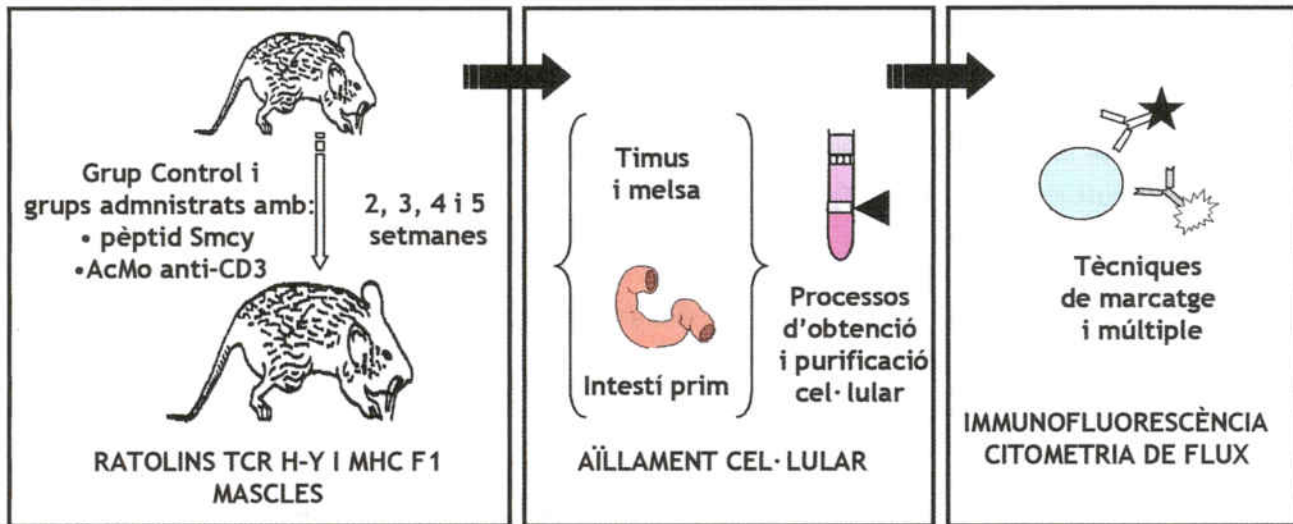
Per tal d'elucidar el desenvolupament de possibles poblacions precursors de IEL CD8 $\alpha\alpha$, s'han emprat ratolins mascles adults TCR H-Y i MHC F1 (8-10 setmanes) (**Figura 8B**). El dia de sacrifici es van obtenir suspensions de IEL i de limfòcits esplènics. D'aquestes suspensions es van separar, per citometria de flux, les subpoblacions CD8 $\alpha\alpha$ +, CD8 $\alpha\beta$ +, i CD8-. Aquestes subpoblacions es van cultivar en presència d'APC esplèniques obtingudes de ratolins Rag2 $^{-/-}$ o en plaques pre-incubades amb AcMo anti-CD3. Després de 48 h d'incubació, es va examinar en les 3 subpoblacions l'expressió de les diferents isoformes de la molècula CD8 per marcatge i citometria de flux.

Per determinar la influència de l'Ag agonista expressat exclusivament a l'intestí, es van utilitzar femelles de 8-10 setmanes d'edat doble transgèniques Smcy TCR H-Y (**Figura 8C**). D'aquests ratolins es van obtenir IEL i limfòcits de melsa i timus, el fenotip dels quals es va determinar per marcatge múltiple i citometria de flux. De forma paral·lela s'ha disposat de mascles i femelles adultes de tipus TCR H-Y com a grup de referència.

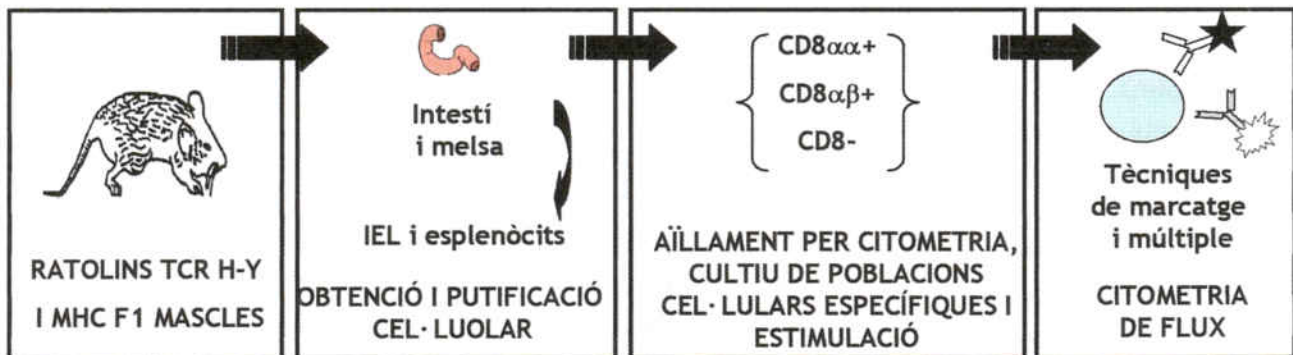
Figura 8

Esquema dels dissenys experimentals seguits per a l'estudi del desenvolupament de IEL CD8 $\alpha\alpha$ + en ratolins transgènics amb TCR H-Y.

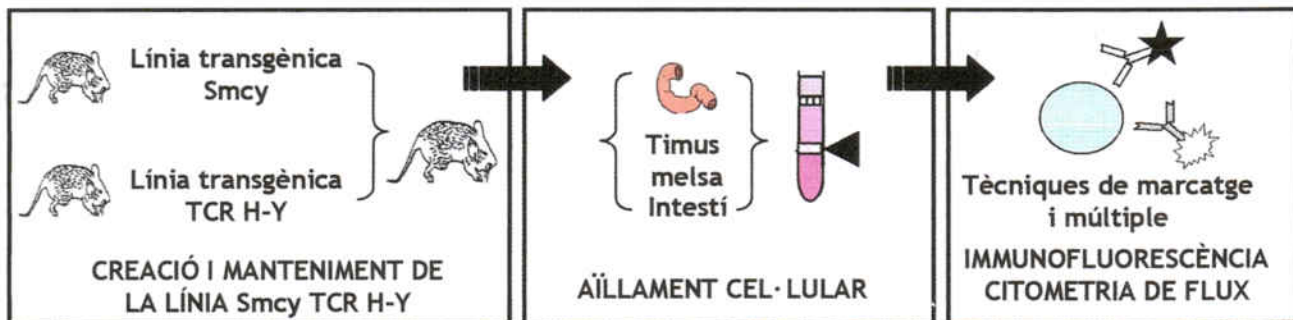
A. ESTUDI ONTOGÈNIC DE RATOLINS TRANSGÈNICS AMB TCR H-Y



B. ESTUDI DE POBLACIONS PRECURSORES DE IEL CD8 $\alpha\alpha$ +



C. ESTUDI DE LA LÍNIA TRANSGÈNICA DE RATOLINS Smcy TCR H-Y



3. OBTENCIÓ DE LIMFÒCITS DE LA MUCOSA INTESTINAL

3.1. EXTRACCIÓ DE L'INTESTÍ PRIM

En rates adultes, rates lactants i ratolins transgènics, es va procedir a l'extracció quirúrgica de l'intestí prim per tal d'obtenir les poblacions limfocítiques corresponents de la mucosa intestinal. Prèviament, els animals es van sacrificar per mètodes humanitaris aprovats pels Comitès Ètics corresponents.

En cada animal es realitza una laparotomia medial i s'exposa l'intestí prim, des de l'esfínter pilòric fins a la unió íleo-cecal. L'eliminació del contingut fecal es realitza *in situ* injectant sèrum fisiològic a 4°C. Seguidament es dissectiona del mesenteri i s'extrau l'intestí prim. En el cas de la rata, l'intestí es pesa, es mesura la seva longitud i es divideix en dues parts iguals, designades com intestí prim proximal (*proximal small intestine, pSI*) - que inclou el duodè i la major part del jejú- i intestí prim distal (*distal small intestine, dSI*) - que inclou la resta del jejú i tot l'il·li-.

Abans de procedir a l'obtenció de IEL en rata, (apartat 3.2.1 de Material i mètodes), els intestins procedents d'animals d'1-4 dies d'edat van ser directament tallats en fragments de 5 mm, mentre que els intestins d'animals d'edat compresa entre 5-14 dies van ser oberts longitudinalment i els intestins procedents d'animals amb una edat de 15-21 dies o adults van ser prèviament evertits amb l'ajut d'una sonda abans de fragmentar-los. Les plaques de Peyer visibles es van excloure de la resta de teixit intestinal.

Per a l'obtenció de IEL en ratolí, (apartat 3.2.2 de Material i mètodes), el teixit intestinal també es va fraccionar prèviament.

3.2. AÏLLAMENT DE LIMFÒCITS INTRAEPITELIALS (IEL)

3.2.1. AÏLLAMENT DE IEL DE RATA

Les suspensions cel·lulars de IEL es van preparar a partir de les parts proximal i distal de l'intestí prim processades individualment, en el cas de rates adultes, o agrupades de 2 en 2 o 4 en 4 en funció de l'edat en el cas de rates lactants.

El mètode emprat es va posar a punt en el nostre laboratori, per adaptar-lo a rata lactant, i està basat en altres mètodes descrits prèviament per teixit procedent d'animals rosegadors adults (Brandtzaeg i col., 1999) i d'origen humà (Carol i col., 1998).

S'ha utilitzat la combinació de dos reactius, prèviament assajats per a comprovar la seva eficàcia, el DTT i l'EDTA, que digereixen el teixit i faciliten l'extracció dels limfòcits. El DTT o 1,4-ditiotreitòl és un agent reductor que trenca els ponts disulfur de les unions intraepiteliais però sense trencar les cèl·lules epitelials, i per tant, permet extreure els IEL mantenint l'estructura de l'epiteli intestinal. L'EDTA o àcid etilendiaminotetraacètic és un agent quelant de cations divalent que dificulta la unió depenent de calci de les cèl·lules epitelials. És un reactiu més agressiu que el DTT i permet extreure tots els IEL, tot i que també allibera cèl·lules epitelials.

L'obtenció d'aquesta població limfocítica s'inicia amb la incubació de les porcions proximal o distal de l'intestí prim, prèviament fragmentades, en una solució 5mM de DTT (Sigma) en HBSS -sense calci ni magnesi- (Gibco) suplementat amb un 20% de FBS (Gibco). Aquesta primera incubació es realitza en un bany amb agitació horitzontal a 37°C durant 20 min. A continuació es decanta el sobrenedant i es reserva en fred.

Seguidament, es realitza una segona incubació de les restes d'intestí en un medi d'EDTA 5 mM (Panreac) en HBSS-10% FBS a 37°C amb agitació horitzontal durant 30 min. Novament es decanta el sobrenedant i es reserva en fred. Aquesta digestió amb EDTA es repeteix en una tercera incubació i de nou es separa el sobrenedant.

Finalment es realitza una última incubació en RPMI-10% de FBS en un bany amb agitació horitzontal a 37°C durant 30 minuts. Passat aquest temps, els fragments d'intestí restants es deixen sedimentar a temperatura ambient durant 10 minuts. A partir d'aquests fragments d'intestí es pot procedir a l'aïllament de LPL, seguint el procés especificat a l'apartat 3.3. de Material i mètodes.

Els sobrenedants procedents de cada incubació es centrifuguen a 500 g a 4°C durant 10 min per separat. Els sediments de cada fase es resuspenen en medi RPMI-1640 (Innogenetics) amb 5% FBS i s'agrupen. La suspensió cel·lular resultant conté IEL i cèl·lules epitelials i requereix un procés posterior d'enriquiment.

3.2.2. AÏLLAMENT DE IEL DE RATOLÍ

El mètode emprat per a l'obtenció de IEL en ratolí es basa en la tècnica emprada anteriorment per Camerini i col. (1993). Aquest mètode comprèn 3 incubacions realitzades durant 20 min en agitació contínua en DTT (Sigma) 1mM en medi HBSS (Invitrogen) sense calci ni magnesi.

Després de cada incubació, les cèl·lules alliberades es decanten de la resta de teixit intestinal i es centrifuguen. Els sediments de cada fase es resuspenen amb RPMI-1640 (Invitrogen) amb 5% de FBS (Invitrogen) i s'agrupen. La suspensió cel·lular resultant, que conté IEL i cèl·lules epitelials procedents de cada incubació, requereix un procés de purificació i enriquiment de IEL (apartat 3.4.3. de Material i mètodes).

3.3. AÏLLAMENT DE LIMFÒCITS DE LAMINA PRÒPIA (LPL) DE RATA

L'obtenció de LPL s'ha portat a terme únicament a partir de la meitat distal de l'intestí prim procedent de rates lactants i adultes, prèvia extracció de IEL (apartat 3.2.1. de Material i mètodes). En el cas de rates lactants, s'han agrupat de 2-4 teixits, en funció de la seva edat per obtenir suficient nombre de cèl·lules.

A l'igual que en el cas de IEL, el procés d'obtenció de LPL s'ha adaptat a rata lactant en el nostre laboratori en base a d'altres mètodes descrits prèviament (Carol i col., 1998).

El procediment més adequat d'obtenció de LPL és diferent segons la finalitat de l'estudi dels limfòcits resultants, és a dir, segons es tracti de l'estudi fenotípic o de la capacitat secretora d'immunoglobulines.

3.3.1. MÈTODE PER A L'ESTUDI FENOTÍPIC DE LPL

El teixit intestinal romanent de l'obtenció de IEL es tritura en fragments d'1 mm² i es submergeixen en 20 mL de medi RPMI-1640 suplementat amb 10% de FBS i es digereix amb col·lagenasa tipus I (Sigma) a la concentració de 300 U/mL. S'incuba durant 90 min a 37°C en agitació constant. S'afegeix 10 mL de medi HBSS i es deixa sedimentar durant 10 min. Es recupera el sobrenedant que conté les cèl·lules alliberades en el procés de digestió i es centrifuga a 500 g durant 10 min a 4°C. El sediment es resuspèn en RPMI-1640 suplementat amb 10% FBS i posteriorment es purifica pel mateix procés que s'utilitza en l'enriquiment de IEL (apartat 3.4. de Material i mètodes).

3.3.2. MÈTODE PER A L'ESTUDI DE CÈL·LULES SECRETORES D'IMMUNOGLOBULINES

El teixit intestinal romanent en l'obtenció de IEL es tritura (1 mm²) i es submergeix en 20 mL d'una solució de col·lagenasa-dispasa (Sigma) d'1,5 mg/mL en medi RPMI-1640 amb 10% FBS durant 45 min, a 37°C i en agitació constant.

Les cèl·lules alliberades se separen dels fragments tissulars afegint 10 mL de medi HBSS i es deixa sedimentar durant 10 min. Es recupera el sobrenedant que conté les cèl·lules alliberades en el procés de digestió i es centrifuga a 500 g durant 10 min a 4°C. El sediment es resuspèn en medi RPMI-1640 suplementat amb 10% FBS. En aquest cas la purificació es realitza únicament per gradient de Percoll (apartat 3.4.2. de Material i mètodes).

3.4. PURIFICACIÓ CEL·LULAR

Com a resultat dels processos d'aïllament de IEL i LPL (apartats 3.2. i 3.3. de Material i mètodes) s'obté la suspensió cel·lular que caldrà purificar per tal d'eliminar les cèl·lules epitelials i d'altres impureses. Amb aquest objectiu s'han utilitzat dues tècniques: columna de llana de vidre i gradient de Percoll.

3.4.1. COLUMNA DE LLANA DE VIDRE

En l'estudi del fenotip de IEL i LPL es procedeix a una primera purificació de la suspensió cel·lular obtinguda per pas a través de columna de llana de vidre.

El mètode consisteix en el pas de la suspensió cel·lular obtinguda a través de 0,145 g de fibra de llana de vidre (Merck) disposada en una xeringa de 10 mL. La columna s'hidrata prèviament fent passar RPMI-1640 suplementat amb 5% FBS.

S'addiciona la suspensió cel·lular a purificar, gota a gota, i posteriorment es renta dues vegades amb medi RPMI-1640 amb 5% FBS. El total del volum obtingut a través de la columna es centrifuga. Es descarta el sobrenedant i s'obté el sediment que conté la població d'interès. Per augmentar la puresa es pot procedir, a continuació, a la purificació per gradient de Percoll.

3.4.2. GRADIENT DE PERCOLL: PURIFICACIÓ DE CÈL·LULES MONONUCLEARS DE RATA

El Percoll està compost per sílica col·loidal i polivinilpirrolidona i s'utilitza, en diferents dilucions, per crear un gradient de concentració adient de forma que la densitat de les cèl·lules que volem aïllar quedi delimitada a la interfase.

L'enriquiment de limfòcits obtinguts de rata s'ha realitzat aplicant una tècnica de doble gradient, és a dir, utilitzant dues fases de concentració discontinua de Percoll. Aquesta tècnica es basa en resuspendre el sediment cel·lular resultant en un Percoll (Amersham Biosciences) al 44% en medi RPMI amb 10% FBS. La suspensió cel·lular resultant se superposa en una solució de Percoll al 67,5% en medi RPMI amb 10% FBS. Seguidament, es centrifuga a 600 g durant 30 min a temperatura ambient. Les cèl·lules epitelials i altres restes tissulars queden a la superfície formant una capa densa. Els limfòcits viables queden a la interfase creada entre les dues solucions de Percoll en forma d'anell i es recuperen mitjançant una pipeta Pasteur.

Les concentracions de Percoll utilitzades són les establertes per a l'aïllament de cèl·lules mononuclears de rata.

3.4.3. GRADIENT DE PERCOLL: PURIFICACIÓ DE CÈL·LULES MONONUCLEARS DE RATOLÍ

Per a la purificació de IEL obtinguts de ratolí s'ha aplicat la tècnica del triple gradient. Aquesta tècnica es fonamenta en establir 3 fases de concentració discontinua de Percoll.

La fase inferior del gradient consisteix en Percoll al 70% en medi RPMI-FBS 10%. Per sobre se situa una solució de Percoll al 40%. Finalment es col·loca el sediment cel·lular de IEL de ratolí resuspès en Percoll al 20%. Es centrifuga a 900 g durant 20 min i a temperatura ambient. En la interfase superior (entre 20 i 40%) queden retingudes cèl·lules epitelials i restes tissulars i en la interfase inferior (entre 40% i 70%) queden acumulats els limfòcits viables. Amb l'ajut d'una pipeta Pasteur connectada al buit, s'eliminen les fases superiors per facilitar l'accés a la interfase desitjada.

4. OBTENCIÓ DE CÈL·LULES D'ALTRES ÒRGANS LIMFOIDES EN RATOLÍ

4.1. OBTENCIÓ DE CÈL·LULES MONONUCLEARS DE TIMUS I MELSA

L'obtenció de cèl·lules mononuclears de timus i melsa s'ha realitzat mitjançant la disgregació mecànica del teixit utilitzant una mà de morter de vidre i malles metàl·liques. En el cas de la suspensió de cèl·lules esplèniques, els eritròcits s'eliminen per lisi osmòtica en una solució de PBS 10X (Gibco) (Camerini i col., 1998).

4.2. OBTENCIÓ DE CÈL·LULES PRESENTADORES D'ANTIGEN DE MELSA

A partir de teixit esplènic procedent de ratolins C57BL10 Rag2^{-/-} (H-2D^{b/b}) -que no conté cèl·lules limfoides- s'ha procedit a l'obtenció de cèl·lules presentadores d'antigen, necessàries per a l'assaig d'estimulació *in vitro* (apartat 7.2 de Material i mètodes). El mètode emprat ha estat la disgregació mecànica i la lisi osmòtica del teixit esplènic descrit a l'apartat anterior.

Les cèl·lules mononuclears resultants es resuspenen en medi DMEM (Gibco) amb 10% FBS, 1% d'aminoàcids no essencials (Sigma), 2mM de glutamina (Gibco), 0.5% de piruvat sòdic (Invitrogen) i 10 µg/mL de gentamicina (Sigma), i es mantenen a 4°C fins al moment de l'assaig.

5. RECOMPTE I DETERMINACIÓ DE LA VIABILITAT CEL·LULAR

El nombre i viabilitat cel·lular de IEL i LPL de rata s'ha estudiat emprant una solució de dos colorants fluorescents: taronja d'acridina (AO, Sigma) i bromur d'etidi (EB, Sigma), els quals permeten diferenciar les cèl·lules viables de no viables. Les cèl·lules vives incorporen el colorant AO, en canvi, les cèl·lules no viables es tenyeixen amb EB. Amb microscopi de fluorescència amb llum ultraviolada, les cèl·lules vives apareixen de color verd, mentre que les mortes són de color taronja.

En el cas de IEL de ratolí s'ha utilitzat la tinció excloent de blau de tripà (Invitrogen) que es basa en la incorporació del colorant en el cas de cèl·lules mortes, mentre que les viables romanen transparents.

En ambdós casos, per realitzar el recompte cel·lular s'utilitzen cambres del tipus Fast-Read 102 New Grid (Boehringer Mannheim), que són una modificació de la cambra Neubauer.

6. ANÀLISI DE LES POBLACIONS LIMFOCÍTQUES PER CITOMETRIA DE FLUX

6.1. MARCATGE DE LIMFÒCITS PER IMMUNOFLUORESCÈNCIA

6.1.1. TÈCNICA DE DOBLE MARCATGE PER A L'ESTUDI DE IEL I LPL DE RATA

Les poblacions limfocítiques de la mucosa intestinal obtingudes -IEL o LPL- es resuspenen en "solució salina de marcatge" que consisteix en PBS que conté 2% FBS i 0,1% NaN_3 (Sigma); aquesta solució és adequada per al marcatge amb AcMo. La suspensió cel·lular es distribueix a raó d'un mínim de 2×10^5 cèl·lules per marcatge.

S'ha emprat la tècnica del doble marcatge amb AcMo directament conjugats amb isotiocianat de fluoresceïna (FITC) o ficoeritrina (PE). A la Taula 4 s'especifiquen els AcMo utilitzats i dirigits contra diferents molècules de superfície de rata.

El doble marcatge es realitza mitjançant incubació de les cèl·lules amb una barreja de concentracions saturants dels AcMo conjugats a FITC i a PE en solució salina de marcatge a 4°C durant 20-30 min a la foscor. Posteriorment es realitza un rentat amb PBS, es fixen amb p-formaldehid (Merck) al 0,5% en sèrum fisiològic i es mantenen a 4°C en la foscor fins al moment del seu processament per citometria de flux.

6.1.2. TÈCNICA DE MARCATGE MÚLTIPLE PER A L'ESTUDI DE LIMFÒCITS DE RATOLÍ

Les cèl·lules mononuclears obtingudes es resuspenen en una solució de PBS que conté 5% de FBS, 0,02 NaN_3 (Sigma) i 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de l'AcMo anti-CD16/CD32 (BD Pharmingen), per tal de bloquejar els receptors Fc que podrien unir-se als AcMo de forma inespecífica. Es distribueix a raó d'un mínim de 2×10^5 cèl·lules mononuclears per marcatge.

Els estudis fenotípics en ratolí s'han realitzat aplicant tècniques de marcatge múltiple utilitzant AcMo conjugats a quatre fluorocroms diferents: FITC, PE, al·lofococianina (APC) i PE-Cy7 unit a avidina que s'unirà a AcMo biotinilats. A la Taula 5 s'especifiquen els AcMo utilitzats i dirigits contra diferents molècules de superfície de ratolí.

Taula 4

Anticossos monoclonals utilitzats en la caracterització fenotípica de limfòcits de rata.

Molècula diana	Clon	Fluorocrom	Subministrador
CD2	OX-32	FITC	Caltag
CD3	1-F4	FITC	BD Pharmingen
CD4	OX-35	FITC / PE	BD Pharmingen
CD5	OX-19	FITC	BD Pharmingen
CD8 α	OX-8	FITC / PE	BD Pharmingen
CD8 α	3.4.1	FITC	Serotec
CD25	OX-39	FITC	BD Pharmingen
CD28	JJ319	FITC	BD Pharmingen
CD44	OX-50	FITC	BD Pharmingen
CD45	OX-1	FITC	BD Pharmingen
CD45RA	OX-33	FITC	BD Pharmingen
CD45RC	OX-22	PE	BD Pharmingen
CD71	OX-26	FITC	BD Pharmingen
CD90	OX-7	FITC	BD Pharmingen
Cadena Ig α	MARA-1	FITC	Serotec
Cadena Ig κ	OX-12	PE	Serotec
NKR-P1A	10/78	FITC	BD Pharmingen
TCR $\alpha\beta$	R73	FITC	BD Pharmingen
TCR $\gamma\delta$	V65	FITC	BD Pharmingen

Taula 5

Anticossos monoclonals utilitzats en la caracterització fenotípica de limfòcits de ratolí.

Molècula diana	Clon	Fluorocrom	Subministrador
CD3	145-2C11	Biotina	BD Pharmingen
CD4	YTS 19.11	Biotina / PE	BD Pharmingen
CD8 α	53-6.7	APC	BD Pharmingen
CD8 β	53-5.8	PE	Biologend
CD45	30-F.11	FITC	BD Pharmingen
CD69	H1-2F3	Biotina / PE	BD Pharmingen
CD103 (α_E)	?	Biotina	BD Pharmingen
TCR H-Y	T3.70	FITC	Biologend

En el procediment de marcatge s'addicionen concentracions òptimes d'AcMo conjugats a FITC, PE, biotina o APC i s'incuben durant 20 min a 4°C. Després de la primera incubació amb l'AcMo primari, les suspensions cel·lulars es renten amb PBS fred que conté NaN_3 0,02% i es resuspenen en solució de marcatge amb una concentració òptima d'Avidina-PE-Cy7 (Caltag) per tal de detectar l'AcMo primari conjugat a biotina. Les cèl·lules s'incuben de nou a 4°C durant 20 min i posteriorment es renten. Finalment es fixen amb una solució al 2% de p-formaldehid (Sigma) en PBS que conté 0,2% NaN_3 .

6.2. CITOMETRIA DE FLUX

Les cèl·lules marcades prèviament, amb AcMo units a fluorocroms, s'analitzen per citometria de flux, que és una tècnica que permet mesurar la mida, la rugositat i la fluorescència de cèl·lules en suspensió.

El citòmetre de flux, és un instrument que fa passar les cèl·lules d'una en una per un tub estret, per on fa incidir un raig de llum làser que excita les cèl·lules i aquestes emeten una radiació fluorescent que s'enregistra. Al mateix temps, uns detectors recullen la informació de la dispersió de la llum, en sentit frontal i en angle recte, produïda al xocar amb les cèl·lules. Tota aquesta informació es transmet a circuits informàtics que integren, analitzen i comparen les dades.

Amb les dades obtingudes, es pot fer un tractament gràfic, representant els resultats en forma de citogrames FSC/SSC, és a dir, gràfiques on es representa la dispersió frontal de la llum (FSC, *Forward Scatter*) respecte la dispersió en angle recte (SSC, *Side Scatter*). El FSC és un paràmetre relacionat amb la mida de la cèl·lula i el SSC depèn de les característiques morfològiques de la cèl·lula, com la rugositat i el nombre d'òrgànuls.

Per processar les dades dels marcatges s'utilitzen histogrames biparamètrics que relacionen les intensitats de fluorescència de 2 fluorocroms utilitzats. D'aquesta manera es pot conèixer el percentatge de cèl·lules marcades (positives) amb cadascun dels dos fluorocroms, amb tots dos o amb cap d'ells.

6.2.1. ANÀLISI DE LIMFÒCITS DE RATA PER CITOMETRIA DE FLUX

Les anàlisis de les suspensions cel·lulars (IEL i LPL) procedents de rata es van realitzar en un citòmetre de flux Epics XL (Coulter Corp., Hialeah, EUA) dels Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona.

Per a cada mostra es va incloure un control negatiu, utilitzant un AcMo control d'isotip (IgG₁). Totes les mostres van ser analitzades considerant la mateixa finestra d'adquisició, la qual va ser definida en funció de la inclusió del 100% de les cèl·lules marcades amb l'AcMo anti-CD45 de rata adulta i de rata de 21 dies d'edat en el cas de IEL; o utilitzant la presència dels marcadors TCR i CD45RA en el cas dels LPL. Una segona finestra d'adquisició va ser creada per a l'estudi de cèl·lules IgA⁺ sense morfologia limfocítica específica.

Els resultats s'expressen com a percentatge de cèl·lules positives per a un determinat marcatge (o per a dos marcatges simultanis) respecte la població limfocítica total (delimitada per la finestra d'adquisició) o respecte una població determinada (CD4⁺, CD8⁺ o NKR-P1A⁺).

L'anàlisi de les dades s'ha portat a terme utilitzant el programa *Epics Elite flow cytometry workstation* versió 3.25 (Coulter).

6.2.2. ANÀLISI DE LIMFÒCITS DE RATOLÍ PER CITOMETRIA DE FLUX

L'anàlisi de les diferents poblacions de cèl·lules mononuclears de ratolí (IEL, esplenòcits i timòcits) es va realitzar en un citòmetre de flux Beckton-Dickinson FACS Calibur (BD Immunocytometry Systems) del *Center of Immunology*, Universitat de Califòrnia-Irvine.

La finestra d'adquisició es va definir en base a la inclusió del 100% de les cèl·lules doblement marcades amb els AcMo anti-CD3 i anti-TCR H-Y. Els resultats s'expressen com a percentatge de cèl·lules positives per a un determinat marcatge respecte la població CD3⁺ TCR H-Y⁺.

Les dades s'han analitzat electrònicament, mitjançant la creació de finestres en un diagrama bicolor utilitzant el programa CellQuest (BD Immunocytometry Systems).

6.2.3. AÏLLAMENT DE SUBPOBLACIONS LIMFOCÍTIQUES DE RATOLÍ

Per citometria de flux es van separar les subpoblacions de limfòcits T CD8⁻, T CD8 $\alpha\beta$ ⁺ i T CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ a partir de suspensions cel·lulars de IEL i de cèl·lules mononuclears de melsa obtingudes de ratolins mascles transgènics H-Y i MHC F1.

Per procedir a aquesta separació, les suspensions cel·lulars es resuspenen en medi RPMI-1640 suplementat amb 10% FBS i s'incuben amb concentracions òptimes d'AcMo anti-CD3 conjugat a PE, anti-CD8 β conjugat a FITC i anti-CD8 α conjugat al fluorocrom APC durant 30 min, seguits d'un rentat amb PBS-FBS 10%.

Es van seleccionar electrònicament els IEL CD3+ dins de la finestra d'adquisició, i els subtipus cel·lulars CD8-, CD8 $\alpha\beta$ + o CD8 $\alpha\alpha$ + van ser aïllats i recuperats mitjançant l'ús d'una finestra semi-logarítmica en un FACS Vantage Cell Sorter (BD Immunocytometry Systems).

Les cèl·lules aïllades, que van presentar una puresa superior al 99%, van ser posteriorment utilitzades en l'assaig d'estimulació *in vitro* (apartat 7.2. de Material i mètodes).

7. ASSAIGS CEL·LULARS *IN VITRO*

7.1. TÈCNICA D'ELISPOT PER A LA QUANTIFICACIÓ DE CÈL·LULES SECRETORES D'IMMUNOGLOBULINES

La tècnica de *Enzyme-Linked Immunospot Technique* (ELISPOT) s'ha utilitzat per tal de quantificar el nombre de cèl·lules secretores d'Ig (*Ig-secreting cells*; Ig-SC) de la làmina pròpia. La tècnica d'ELISPOT emprada és una adaptació de la descrita prèviament per Carol i col. (1998).

La tècnica es realitza sobre plaques de 96 pous amb membrana de nitrocel·lulosa (MultiScreen MAHAN 4510, Millipore). La tècnica consisteix en la incubació de les plaques amb AcMo anti-IgA, anti-IgG o anti-IgM de rata (clons A93-2, G53-238 i G28-5, respectivament, BD Pharmingen). S'afegeixen 100 µL/pou de dilucions d'AcMo a 15 µg/mL en PBS i es deixa durant tota la nit a 4°C en cambra humida.

Després de rentar la placa, els possibles llocs d'unió romanents en els pous es bloquegen amb 200 µL/pou de medi RPMI amb 10% FBS durant 1h a 37°C. Posteriorment, s'addiciona a cada pou, sempre en forma de duplicats, 100 µL d'una dilució seriada de la suspensió de cèl·lules de làmina pròpia obtingudes mitjançant digestió (apartat 3.3.2. de Material i mètodes) i gradient de Percoll (apartat 3.4.2. de Material i mètodes): 2×10^5 , 1×10^5 , 5×10^4 i $2,5 \times 10^4$ cèl·lules. Les plaques s'incuben durant 20 h a 37°C. Posteriorment, per tal d'eliminar les cèl·lules, les plaques es renten amb una solució de PBS que conte 0,25% de Tween-20 (PBS-Tw, 10 rentats) i amb H₂O destil·lada (1 rentat).

El següent pas consisteix en l'addició de 100 µL/pou d'AcMo anti-IgA, anti-IgG o anti-IgM de rata conjugats a biotina (2 µg/mL, BD Pharmingen) i la seva incubació en cambra humida durant 2 h a temperatura ambient. Després de rentar la placa (5 x PBS-Tw), s'afegeixen 100 µL/pou del conjugat extravidina-peroxidasa (4 µg/mL en PBS, Sigma) durant 1 h. Les plaques es renten de nou (5 x PBS), i s'addiciona la solució amb el substrat H₂O₂ i el cromogen AEC (3-amino-9-etilcarbazol, Sigma) en 0,1 M de solució d'acetat. La reacció enzimàtica es visualitza després de 30 min. La reacció s'atura mitjançant rentat amb aigua abundant sota l'aixeta.

Les taques ocasionades per cada cèl·lula secretora o *spots* es quantifiquen amb l'ajut d'una lupa o bé automàticament utilitzant el sistema ELISPOT-reader (AID Diagnostica). Els resultats s'expressen com a nombre de Ig-SC per 10^6 cèl·lules.

7.2. ASSAIG D'ESTIMULACIÓ IN VITRO DE SUBPOBLACIONS LIMFOCÍTIQUES

Per aquest assaig s'han utilitzat subpoblacions de limfòcits T CD8-, T CD8 $\alpha\beta$ + i T CD8 $\alpha\alpha$ + obtingudes de ratolins mascles transgènics TCR H-Y i MHC F1 (apartat 6.2.3. de Material i mètodes).

Les suspensions cel·lulars es resuspenen en medi DMEM (Gibco), i es distribueixen en plaques de 96 pous de base plana a raó de 1×10^6 cèl·lules/pou. Els pous de les plaques havien estat pre-incubats amb 10 $\mu\text{g/mL}$ d'AcMo anti-CD3 (BD Biosciences) o co-cultivat amb cèl·lules APC sense fraccionar obtingudes a partir de melsa de ratolins mascles C57BL/10 Rag2^{-/-} (apartat 4.2. de Material i mètodes). La proporció d'APC respecte les cèl·lules T aïllades va ser de 10:1.

Les cèl·lules es cultiven durant 48-72 h a 37°C amb atmosfera de 5% de CO₂. Posteriorment es recuperen les cèl·lules i es resuspenen en solució salina de marcatge amb AcMo anti-CD3 conjugat a PE, AcMo anti-CD8 β conjugat a FITC o AcMo anti-CD8 α conjugat al fluorocrom APC (BD Biosciences) tal i com s'ha descrit anteriorment (apartat 6.1.2. de Material i mètodes). Finalment, s'addicionen 10 $\mu\text{g/mL}$ de 7-aminoactinomicina (7-AAD; Molecular Probes, Eugene, EUA), seguint les recomanacions descrites pel fabricant, per tal d'excloure les cèl·lules no viables durant l'anàlisi citomètrica. D'aquesta manera, les cèl·lules s'analitzen per citometria de flux en les 4 hores posteriors a la preparació.

8. DESENVOLUPAMENT DE LA LÍNIA DOBLE TRANSGÈNICA DE RATOLÍ Smcy TCR H-Y

8.1. OBTENCIÓ DEL PLASMIDI pFABP Smcy

El cDNA per Smcy de ratolí va ser clonat i expressat, sota el control del promotor mínim per FABP (*fatty acid binding protein promoter*) anomenat iFABP, de forma exclusiva en el tracte intestinal de ratolí (Figura 9) (Simon i col., 1997).

El fragment de 780 bp que conté el promotor iFABP deriva del vector pTS4 (cedit per la Dra. Hilde Cheroutre, La Jolla Institute for Allergy and Immunology, San Diego) i es purifica a partir del gel d'agarosa (Qiaex system, Quiagen) després de la restricció enzimàtica amb els enzims EcoRI i BamHI (Promega). El fragment resultant s'insereix en el plasmidi pBluescript-II digerit també amb els mateixos enzims de restricció, EcoRI i BamHI.

El cDNA per Smcy que conté l'epítot específic del TCR H-Y es purifica mitjançant electroforesi del pcDNA1.1 que conté un subclon del transcrit Smcy (cedit per E. Simpson, Hammersmith Hospital London després de la seva restricció amb BamHI i XbaI (Promega). El fragment de Smcy resultant s'insereix en el vector pBluescript II-iFABP, construït amb llocs de restricció per BamHI i XbaI.

La regió intrònica SV40 i el senyal de poliadenilació deriven del CDM8 i es subclonen en vectors pMCS5 amb llocs de restricció per XbaI i BamHI. Posteriorment, aquest fragment es purifica del pMCS5 mitjançant digestió amb XbaI i SacI per tal de clonar-lo directament en la construcció que conté el fragment del promotor iFABP i el cDNA de Smcy, originant el pFABP Smcy (5,5 kb). A continuació es purifica el fragment de 2,6 kb que conté el promotor iFABP de 780 pb, el fragment de Smcy d'1 kb, el fragment de 800 pb corresponent a l'intró SV40 i el lloc de poliadenilació.

L'obtenció del plasmidi la va portar a terme la Dra. Victoria Camerini del Department of Pediatrics, University of Virginia.

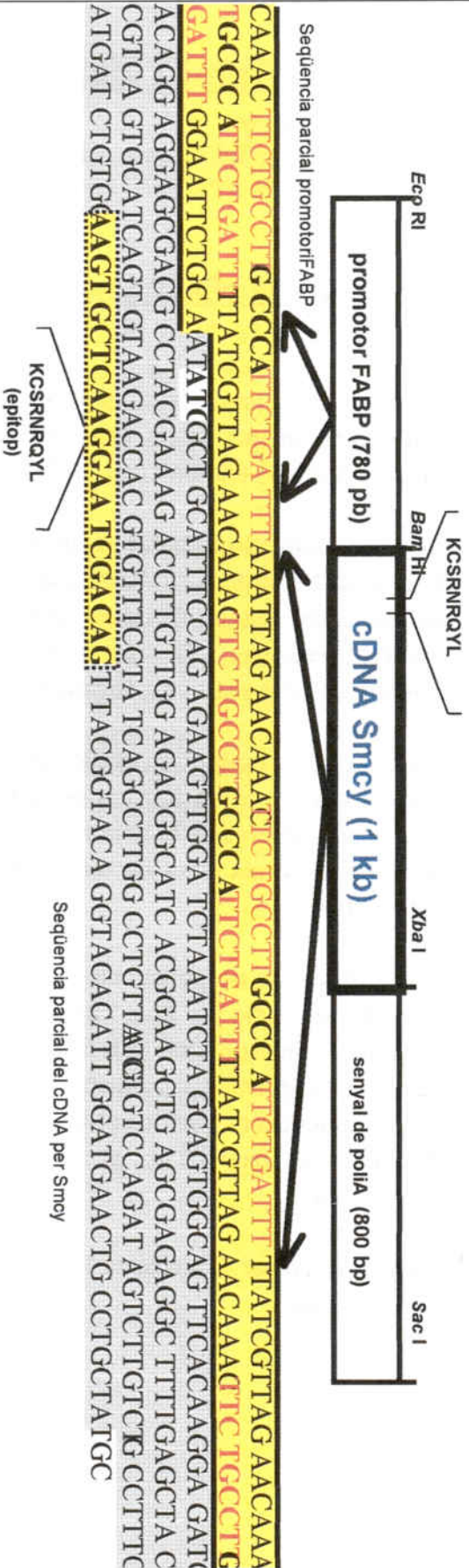


Figura 9

Construcció plasmídica, creada per la Prof. Dra. Victoria Camerini, utilitzada en la generació de la línia doble transgència Smcy TCR H-Y. El fragment consta del promotor que dirigeix l'expressió a nivell intestinal (iFABP), el transgen (Smcy cDNA), i les porcions necessàries per la seva correcta transcripció. Es detallen seqüències pricipals tnt del promotor (groc), com del transgen (gris) que conté l'epítip que s'uneix amb alta afinitat al TCR H-Y.

8.2. OBTENCIÓ DE LÍNIES TRANSGÈNIQUES DE RATOLINS PER A L'EXPRESSION INTESINAL DE Smcy

El fragment de 2,6 Kb, purificat com s'ha descrit, va ser injectat a oòcits fecundats que van ser transferits a ratolins C57BL/10 utilitzant tècniques estàndards (Hogan i col., 1986; Taketo i col., 1991). Aquesta part del treball es va portar a terme a La Jolla Institute for Allergy and Immunology, San Diego, a càrrec de la Dra. Hilde Cheroutre i el Dr. Chris Lenna.

Els animals transgènics originats es van mantenir a l'estabulari de la Universitat de Califòrnia, Irvine, en un ambient lliure de patògens i condicions de flux laminar.

L'expansió i estabilització de la línia transgènica, s'ha realitzat en el mateix servei d'estabulari, mitjançant l'encreuament dels animals fundadors amb ratolins C57BL/10 Rag2^{-/-}. De forma individual, en cadascun dels animals generats (C57BL/10 Rag2^{-/-} Smcy) es va analitzar, per PCR, la presència del transgen Smcy en el DNA genòmic procedent d'una petita secció de la cua obtinguda abans dels 21 dies d'edat, seguint la normativa vigent.

Una vegada confirmada la positivitat per a la presència del transgen, es va procedir a la creació d'una nova línia d'animals que constitueixen l'objecte d'estudi d'aquest treball, els animals doble transgènics: que expressen Smcy a nivell intestinal i el TCR H-Y en animals Rag2^{-/-}. Així, es van realitzar diversos encreuaments entre els ratolins Smcy Rag2^{-/-} i els ratolins TCR H-Y (subministrats per Taconic).

A partir dels animals de la línia doble transgènica creada, els ratolins Smcy TCR H-Y, s'ha analitzat la presència dels dos transgens, l'epítip Smcy i el TCR H-Y, per tècniques de PCR a partir de DNA genòmic obtingut de teixit de la cua de cada animal de forma rutinària.

La línia de ratolins transgènics Smcy TCR H-Y s'ha mostrat estable fins a l'actualitat que correspon a la 7^a generació.

8.3. CONFIRMACIÓ DE LA PRESENCIA I EXPRESSIÓ DEL TRANSGEN Smcy

8.3.1. EXTRACCIÓ DE DNA GENÒMIC

En cada animal de la doble línia transgènica a estudiar s'analitza la presència dels transgens Smcy i TCR H-Y.

Per això, abans dels 21 dies d'edat se'ls hi secciona una petita part distal de la cua, a partir de la qual s'extrau el DNA genòmic mitjançant l'ús del kit Dneasy™ Tissue (Qiagen). Breument, el teixit s'introdueix en un eppendorf amb 180 µL de solució ATL i 20 µL de solució de Proteinasa K, es barreja i s'incuba en un bany d'aigua a 55°C fins que el teixit queda totalment digerit (6-8h).

Quan el teixit està totalment lisat, es centrifuga a 8000 g i es descarta el precipitat que conté restes no digerides. El sobrenedant es transfereix a un nou tub, on s'addicionen 400 µL d'una barreja 1:1 de solució AL:etanol absolut i es barreja vigorosament. Aquesta barreja es disposa en les mini-columnnes proveïdes pel kit sobre tubs col·lectors de 2 mL i es centrifuga a 8000 g durant 1 min. Es descarta el tub col·lector amb el sobrenedant i es col·loca un tub nou. S'afegeix 500 µL de solució AW-1 i es centrifuga (8000 g). Seguidament s'addiciona 500 µL de solució AW-2 i es centrifuga (14000 g). Finalment, s'addicionen 200 µL de solució AL, s'incuba durant 1 min a temperatura ambient i es centrifuga (8000 g, 1 minut) per tal d'eluir el contingut, sobre el tub col·lector definitiu. El DNA obtingut es quantifica per espectrofotometria.

8.3.2. EXTRACCIÓ DE RNA

A partir de fragments de diferents teixits (melsa, intestí prim proximal, medial i distal i intestí gros) es va procedir a l'extracció del RNA total mitjançant l'ús del kit RNeasy® (Qiagen) seguint el protocol descrit pel fabricant. De forma resumida, es parteix d'aproximadament uns 30 mg de teixit, que s'estabilitzen amb el reactiu RNAlater i es congelen a -80°C.

Les mostres congelades es col·loquen en un morter amb nitrogen líquid i s'homogeneïtzen amb la mà de morter. Els fragments o pols de teixit i el nitrogen líquid es decanten en tubs de micro-centrifuga de 2 mL, lliures de RNases i submergits en nitrogen líquid. Un cop s'evapora el nitrogen, s'afegeixen 600 µL de la solució RLT i el lisat obtingut es transfereix a una columneta de microcentrifuga de tipus QIAshredder sobre un tub col·lector de 2 mL. Es centrifuga a màxima velocitat durant 3 minuts, es transfereix el sobrenedant a un tub nou on s'afegeix 1 volum d'etanol 70% i es barreja amb la pipeta. Seguidament es passen 700 µL de la barreja obtinguda a una mini-columnna del kit sobre un tub col·lector de 2 mL i es centrifuga durant 15 s a 10000 g. Una vegada descartat el tub col·lector, s'afegeixen 700 µL de la solució RW1 a la columna i es centrifuga de nou en les mateixes condicions. Aquest procés es repeteix dues vegades més amb 500 µL de la solució de rentat RPE. Es deixa assecar la membrana de sílica-gel de la columna, s'afegeixen, directament sobre la membrana, 50 µL d'aigua lliure de RNases i s'elueix el RNA retingut en aquesta per centrifugació a 10000 g. Normalment, la quantitat obtinguda és d'uns 30 µg, però en cas de

voler obtenir més mostra, es pot eluir de nou la columna. El RNA es quantifica per espectrofotometria.

8.3.3. QUANTIFICACIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS

El DNA i RNA obtinguts es van quantificar mitjançant l'espectrofotòmetre Genequant (Amersham Pharmacia Biotech). Les mostres es llegeixen a 260nm i 280 nm, per àcids nucleics i proteïnes, respectivament. L'espectrofotometre proporciona els resultats de concentració en µg/mL i de puresa com a relació A_{260nm}/A_{280nm} . En tots els casos, el rang de concentració va estar entre 50-200 ng/µL i la puresa adequada per a processos posteriors.

8.3.4. SÍNTESI DEL cDNA

Per tal d'obtenir el cDNA, de forma prèvia a la PCR, s'ha utilitzat el Kit Ready-To-Go-Prime-First-Strand-Beads (Amersham Biosciences). De forma resumida, la mostra de RNA (de 100 ng a 5 µg de RNA total) es porta a un volum final comprès entre 25-30 µL amb aigua-DEPC i s'escalfa a 65°C durant 10 min en el termociclador (model PTC-100™, MJ Research Inc).

La solució de RNA es transfereix al tub que conté les perles amb la barreja de reactius per a la síntesi del cDNA: solució amortidora, dNTP, transcriptasa reversa murina (FPLCpure™, inhibidor de RNases de tipus RNAGuard™), i albúmina sèrica bovina lliure de RNases/DNases. Sense barrejar, s'afegeix l'encebador pd(N)₆ i aigua-DEPC fins a un volum final de 33 µL i es deixa durant 1 min a temperatura ambient. S'agita el contingut del tub, es centrifuga i s'incuba a 37°C durant 60 min. Passat aquest temps, la primera cadena del DNA està llesta per a la seva amplificació per PCR.

8.3.5. REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Mitjançant la tècnica de PCR s'ha amplificat el DNA genòmic pel transgen Smcy, TCR H-Y i el cDNA pel transgen Smcy. Com a controls interns, s'han amplificat els gens següents: p53 en el cas del DNA genòmic, i β-actina i SCF (*Stem Cell Factor*) en l'estudi d'expressió. La seqüència dels encebadors utilitzats en cada cas es troba a la Taula 6.

Taula 6: Encebadors utilitzats en les PCR de DNA genòmic i cDNA.

Encebador	Seqüència 5'-3'	Producte	T ^a d'unió
FABP-Smcy (s) (as)	GAACAAACTTCTGCCTTGCC GAAATACAAGCCTCTGCTTCAG	782 pb	63°C
Smcy (s) (as)	CTACGAAAGACCTTGTTGGAG GAAATACAAGCCTCTGCTTCAG	400pb	57°C
TCR H-Y (s) (as)	GACATTGACTGTAATCAGAC ACAGCGTTTCTGCACTGTTATCACC	246 pb	57°C
P53 (s) (as)	TCACTGCATGGACGATCTGTTGC GATGATGGTAAGGATAGGTCGGCG	710 pb	65°C
β -actina (s) (as)	ATGGATGACGATATCGCT ATGAGGTAGTCTGTCAGGT	615 pb	65°C
SCF (s) (as)	CCGGATCCTGGAGCTCCAGAACAGCTAA GGCTGCAGTCCATTACACCTCTTGAA	861 pb	65°C

Els encebadors per a l'amplificació del Smcy genòmic estan dissenyats per tal d'amplificar la part codificant per l'epítot d'alta afinitat amb el TCR H-Y (KCSRNRQY) sense que presentin homologia en el gen equivalent en el cromosoma X (Smcx). L'encebador 5' per a l'amplificació del Smcy transgènic s'uneix específicament a la seqüència del promotor FABP i, per tant, el Smcy genòmic no s'amplifica. Els encebadors utilitzats per a l'amplificació del TCR H-Y estan dirigits a la cadena β del TCR, concretament a la regió CDR-3 de la zona V β 8.2-D β 1-J β 2.3 (Cruz et al, 1998).

De forma breu, les diferents PCR s'han portat a terme a partir de 100 ng de cDNA o DNA genòmic, que equival a un volum inferior a 2 μ L en el cas de DNA genòmic i inferior a 5 μ L en el cas del cDNA. S'afegeix aigua purificada fins a un volum final de 10 μ L i a continuació una barreja (17,5 μ L) amb els reactius necessaris: 5 μ L de barreja de dNTP en solució amortidora (0,2 mM de cada dNTP, Tris-HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50mM i MgCl₂ 1,5 mM; Fischer Scientific), 1 μ L de cada encebador (Oligos etc Inc) i 0,5 μ L de Taq polimerasa (Fisher Scientific). El procés d'amplificació de les mostres s'inicia amb una etapa de desnaturalització de 4 min a 95°C en el termociclador, i a continuació es fan 35 cicles de desnaturalització (95°C, 30 s), unió dels encebadors (temperatura adequada segons la taula 6) i fase d'extensió (72°C, 30 s).

8.3.6. ELECTROFORESI I VISUALITZACIÓ DELS PRODUCTES DE PCR

Els productes d'amplificació de la PCR es van desenvolupar electroforèticament en gels d'agarosa al 2% (Fisher Scientific) mitjançant una font d'alimentació i cubeta de E-C Aparatus Corporation.

Els gels d'agarosa es van preparar en solució TAE 1X, preparada a partir de solució 10X (Fisher Scientific) amb una concentració de bromur d'etidi a 0,5 mg/mL (Sigma). L'electroforesi es realitza a baix voltatge i intensitat per incrementar la resolució. La visualització s'ha realitzat amb un transil·luminador de llum UV Fisher-88A.

En tots els casos, s'ha confirmat la mida dels productes amplificats mitjançant el marcador de pes molecular 123bp DNA ladder (Fisher Scientific). Les imatges s'han captat fotogràficament mitjançant una càmera de foto-documentació Polaroid FB-PDC-34 (Fisher Scientific), o de forma digital amb un dispositiu Foto/Prep I Edas-290 (Kodak). L'anàlisi de la intensitat de les bandes, per confirmar les dades visuals obtingudes en l'estudi d'expressió, s'ha realitzat utilitzant el Software d'anàlisi 1D Image versió 3.6 (Kodak).

9. ANÀLISI ESTADÍSTICA DELS RESULTATS

En tots els casos, l'anàlisi estadística s'ha realitzat mitjançant l'anàlisi convencional de la variança (ANOVA). Per a cada variable dependent (per exemple, cèl·lules CD8+ o IgM-SC), es va considerar com a variable independent l'edat dels animals (dies 1-21 en el cas de l'estudi en rata o 2-5 setmanes en el cas de l'estudi en ratolí); així com la localització intestinal (pSI or dSI) en el cas de l'estudi dels IEL de rata. Posteriorment, s'han realitzat comparacions *post hoc* (LSD test) quan la variable edat o localització intestinal presentava un efecte significatiu sobre la variable dependent.

A més a més, l'existència de possibles diferències entre animals adults i de 21 dies d'edat o entre pSI i dSI en rates adultes s'ha analitzat mitjançant el test de la *U* de Mann-Whitney. Totes les anàlisis s'han realitzat utilitzant el programa Statistica™ (Stat Soft®, Tulsa, UK). S'ha acceptat que les diferències eren significatives quan la $p < 0,05$.



RESULTATS



1. CANVIS MORFOMÈTRICS EN L'INTESTÍ PRIM

De forma prèvia a l'estudi fenotípic, s'han estudiat els canvis en el pes i longitud intestinal, així com en el pes corporal de rates lactants i animals adults (Taula 7).

Durant les tres primeres setmanes de vida, tant el pes corporal com el pes de l'intestí proximal incrementen sis vegades. L'increment de pes és molt més manifest en l'intestí distal que és superior a les vuit vegades. Durant el mateix període la longitud total de l'intestí prim no arriba a triplicar-se.

El pes de la meitat proximal de l'intestí (pSI) és significativament superior al de la meitat distal (dSI) ($p < 0,05$) durant tot el període de lactància, encara que la relació entre el pes de pSI/dSI disminueix amb l'edat, i el dia del deslletament (dia 21) arriba a valors similars a aquells trobats en rates adultes.

Taula 7

Pes corporal i pes i longitud de l'intestí prim de rates lactants i adultes

Edat (dies)	1	3	5	7	11	14	21	Adulta
Pes corporal	6.58±0,023	8.50±0,034	11.36±0,040	12.53±0,076	16.95±0,099	24.74±0,106	40.71±0,247	201.0±3.45
(g)	(23)	(31)	(23)	(16)	(16)	(17)	(16)	(16)
Pes del pSI*	0.126±0,002	0.196±0,002	0.252±0,001	0.274±0,002	0.350±0,003	0.464±0,005	0.866±0,017	3.411±0,179
(g)	(22)	(32)	(19)	(16)	(15)	(17)	(16)	(16)
Pes del dSI*	0,080±0,001	0.127±0,003	0.184±0,003	0.184±0,001	0.249±0,002	0.323±0,003	0.685±0,012	3.336±0,179
(g)	(21)	(31)	(19)	(16)	(15)	(17)	(16)	(16)
pSI/dSI	1.576±0,024	1.498±0,036	1.467±0,023	1.505±0,013	1.430±0,015	1.452±0,013	1.263±0,013	1.020±0,012
	(21)	(31)	(19)	(16)	(15)	(17)	(16)	(16)
Longitud intestinal	18.50±0,074	22.72±0,081	27.74±0,071	27.87±0,094	32.09±0,091	37.44±0,140	49.19±0,225	81.00±1.384
(cm)	(23)	(30)	(23)	(16)	(16)	(17)	(16)	(16)

*pSI i dSI correspon a intestí prim proximal i distal, respectivament.

Les dades corresponen a la mitjana ± EEM del nombre d'animals mostrat entre parèntesi.

2. ESTUDI DELS CANVIS FENOTÍPICS EN LIMFÒCITS T I CÈL·LULES NK INTRAEPITELIALS DE L'INTESTÍ PRIM DE RATES LACTANTS

2.1. PROPORCIÓ DE LIMFÒCITS CD45+ I CD3+

El contingut de cèl·lules mononuclears de llinatge limfoide es va establir mitjançant els citogrames FSC/SSC i el marcatge per a les cèl·lules CD45+.

La **Figura 10A** mostra citogrames representatius de IEL obtinguts d'animals neonats i d'animals en edat adulta. El dia del naixement (dia 1), no es visualitza l'agregat cel·lular amb el patró morfològic típic dels limfòcits (**Figura 10A**), però aquest s'evidencia a partir del dia 3 (**Figures 10B i 10C**).

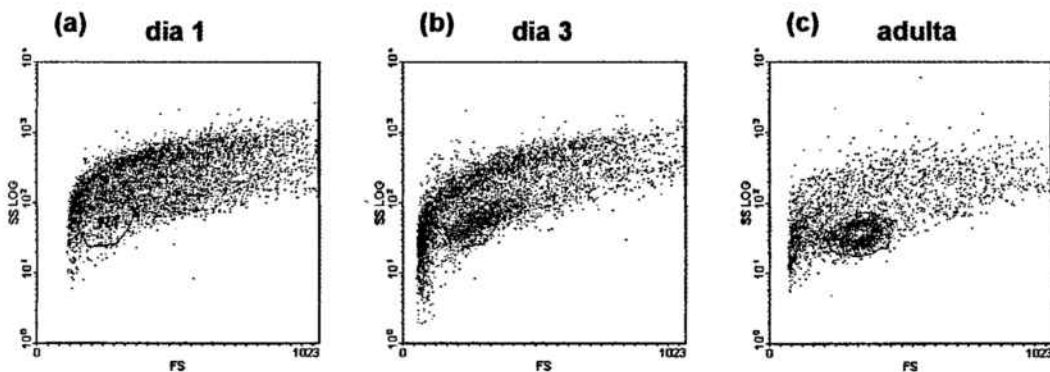


Figura 10

Citogrames FSC/SSC representatius procedents de la suspensió cel·lular obtinguda després de l'aïllament i purificació de IEL. (A) Mostra obtinguda de l'intestí prim de rates el dia de naixement; (B) mostra representativa de l'intestí prim d'una rata de 3 dies d'edat; (C) mostra procedent de l'intestí prim de rata adulta. L'agregat cel·lular de patró limfocític es detecta a partir del dia 3.

El dia de naixement, només un 40% i un 30% de les cèl·lules incloses en la finestra limfocítica seleccionada van mostrar un marcatge positiu per a la molècula CD45 tant en pSI com dSI, respectivament (**Figura 11A**). El contingut de IEL, establert mitjançant el marcatge CD45+ tant en pSI com dSI, presenta un increment important durant el període de

lactància ($p < 0,001$). Així, el dia 3, la molècula CD45 ja es presenta en el 85% de les cèl·lules seleccionades obtingudes del pSI i en un 90-95% des del dia 5 fins a l'edat adulta. En el dSI, la proporció de cèl·lules CD45+ dins de la finestra limfocítica va ser significativament inferior a la determinada en el pSI durant l'interval comprès entre els dies 3-7 ($p < 0,05$) i no assoleix el màxim percentatge fins al dia 14 postnatal (Figura 11A).

La proporció de IEL CD3+ en la finestra limfocítica durant el període d'alletament (Figura 11B) es modifica en funció de l'edat de l'animal ($p < 0,001$), i no s'observen diferències significatives entre els dos fragments intestinals estudiats. El dia de naixement, el percentatge de cèl·lules CD3+ és superior al 60% tant en pSI com en dSI, la qual cosa demostra que la molècula CD3 apareix de forma més precoç que la molècula CD45 (~40%) en la superfície de IEL. Al final del període de lactància, la proporció de IEL CD3+ assoleix els valors de rata adulta en el dSI (~90%) però no en el pSI (76% i 90% en rates de 21 dies d'edat i rates adultes, respectivament ($p < 0,05$)).

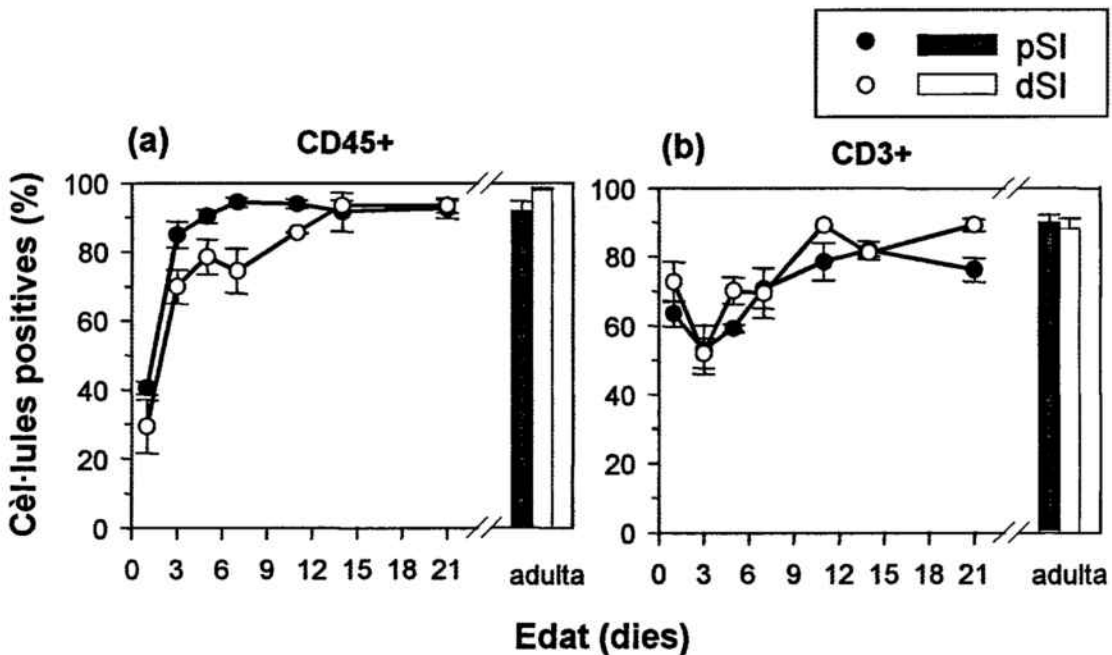


Figura 11

Percentatge de cèl·lules CD45+ i CD3+ en IEL durant el període de lactància i en rates adultes. Cèl·lules (A) CD45+ i (B) CD3+ respecte el total de IEL, inclosos en la finestra d'adquisició, procedents de l'intestí prim proximal i distal (pSI i dSI, respectivament). Els resultats estan expressats com a mitjana \pm EEM de 4-8 valors, cadascun procedent de 2-4 animals agrupats segons l'edat.

Per tal de descartar la possibilitat de contaminació per LPL en la població intraepitelial, es va evaluar la presència de limfòcits B en les suspensions de IEL obtingudes. En totes les mostres processades, el percentatge de cèl·lules CD45RA+ va ser inferior al 2% durant tot el període estudiat.

2.2. CANVIS EN EL FENOTIP DE CÈL·LULES NK INTRAEPITELIALS EN RATES NEONATES

La proporció de IEL que expressen la molècula NKR-P1A en rates neonates va ser superior durant tot el període de lactància a la de rates adultes ($p < 0,05$), i es van observar també diferències significatives entre les porcions pSI i dSI en animals de 3-7 dies ($p < 0,01$) (Figura 12). En aquest marge d'edat, el percentatge de cèl·lules NK en pSI és aproximadament el doble que en dSI. A partir del dia 11 i fins al dia 21, la proporció de cèl·lules NK va disminuir, sense assolir el percentatge present en animal adult ($p < 0,05$).

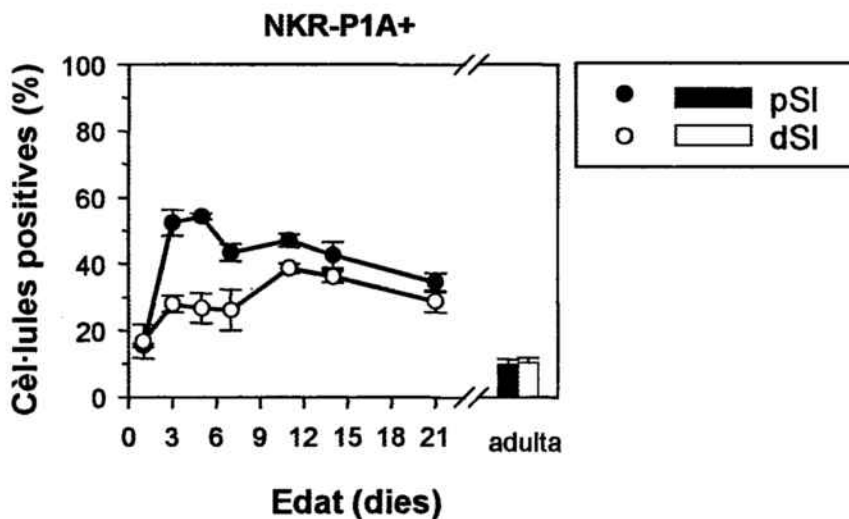


Figura 12

Percentatge de cèl·lules NKR-P1A+ en IEL durant el període de lactància i en rates adultes. Cèl·lules NKR-P1A+ respecte el total de IEL, inclosos en la finestra d'adquisició, procedents de l'intestí prim proximal i distal (pSI i dSI, respectivament). Els resultats s'expressen com a mitjana \pm EEM de 4-8 valors, cadascun procedent de 2-4 animals agrupats segons l'edat.

La Figura 13 mostra citogrames representatius que permeten visualitzar les diferències en el patró d'expressió de les molècules CD8 i NKR-P1A en IEL obtinguts de rates neonates i d'animals adults. El dia de naixement, la meitat de IEL NKR-P1A+, en ambdós fragments

intestinals, co-expressen la molècula CD8 en la seva superfície (Figura 14A). Aquesta proporció incrementa fins a superar el 80% durant els primers 5 dies de vida i després disminueix progressivament. Quan l'animal assoleix la tercera setmana de vida, el percentatge de IEL NKR-P1A+CD8+ respecte el total de cèl·lules NK en l'epiteli intestinal va ser superior en el cas del dSI que no pas en el pSI ($p < 0,001$) i en cap de les dues porcions intestinals es van trobar diferències significatives en comparar-lo amb l'animal adult. La Figura 14B mostra la subpoblació complementària NKR-P1A+CD8- que, tal i com es pot apreciar, representa la població principal el dia del deslletament i en rates adultes.

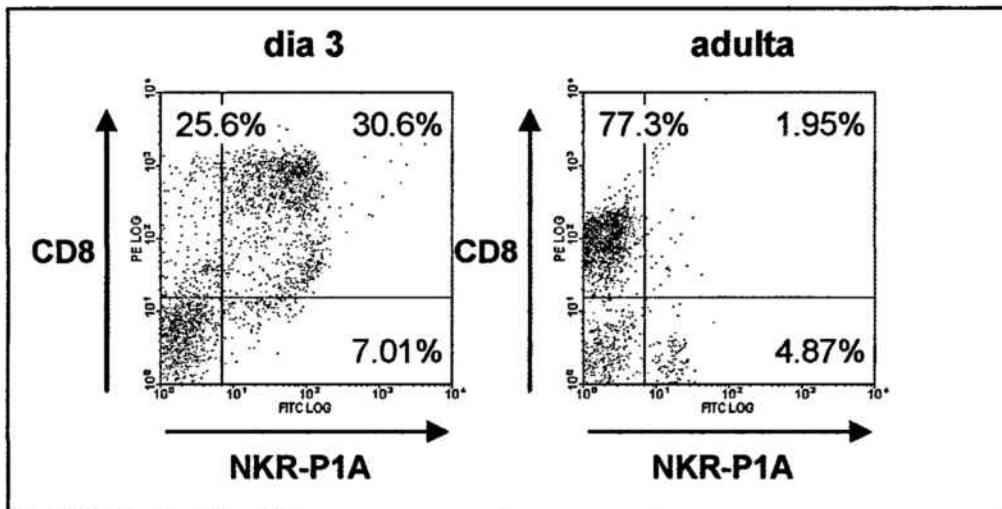


Figura 13

Desenvolupament fenotípic de cèl·lules NK intraepitelials durant el període de lactància i en rates adultes. Citogrames representatius de la freqüència de distribució de la intensitat de fluorescència obtinguda per doble marcatge amb els AcMo anti-NKR-P1A i anti-CD8 dels IEL procedents de recent nascuts (3 dies d'edat) i de rata adulta.

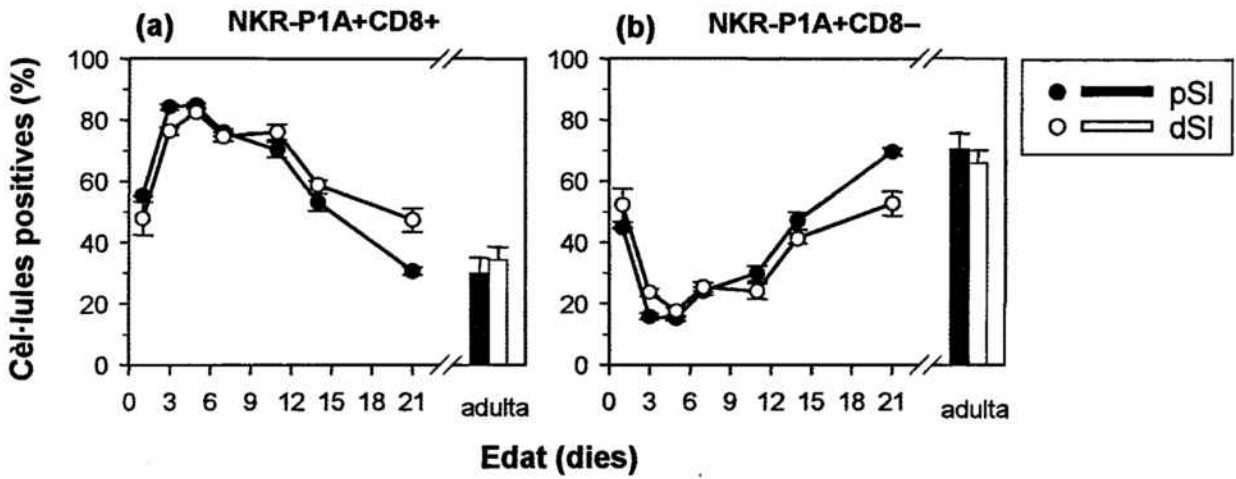


Figura 14

Desenvolupament fenotípic de cèl·lules NK intraepitelials durant el període de lactància i en rates adultes. (A) Cèl·lules NKR-P1A+CD8+ i (B) cèl·lules NKR-P1A+CD8- respecte el total de cèl·lules NKR-P1A+ en intestí prim proximal i distal (pSI i dSI, respectivament). Els resultats s'expressen com a mitjana \pm EEM de 4-8 valors, cadascun procedent de 2-4 animals agrupats segons l'edat.

2.3. CANVIS EN L'EXPRESSIÓ DE CD4 I CD8 EN IEL DURANT LA LACTÀNCIA

El marcatge amb AcMo dirigits contra els coreceptors CD4 i CD8 posa de manifest la presència de cèl·lules doble positives (DP), doble negatives (DN), així com CD8+CD4-, majoritàries en IEL, i CD4+CD8-.

El percentatge de IEL CD8+CD4- en ambdues parts intestinals, pSI i dSI, incrementa de forma dràstica durant els primers dies de vida (Figura 15). En el pSI, els IEL CD8+CD4- disminueixen a partir del dia 7 i fins al final del període de lactància. En el dSI el comportament és diferent, ja que el percentatge de IEL CD8+CD4- es manté al voltant del 60-65% entre els dies 7-21. Així, la proporció de IEL CD8+CD4- en el dSI és superior que en el pSI en animals de 21 dies d'edat ($p < 0,05$). Els animals adults presenten una proporció de IEL CD8+CD4- que no difereix significativament de l'establerta per a animals de 21 dies d'edat, així com tampoc s'observen diferències entre ambdues porcions intestinals.

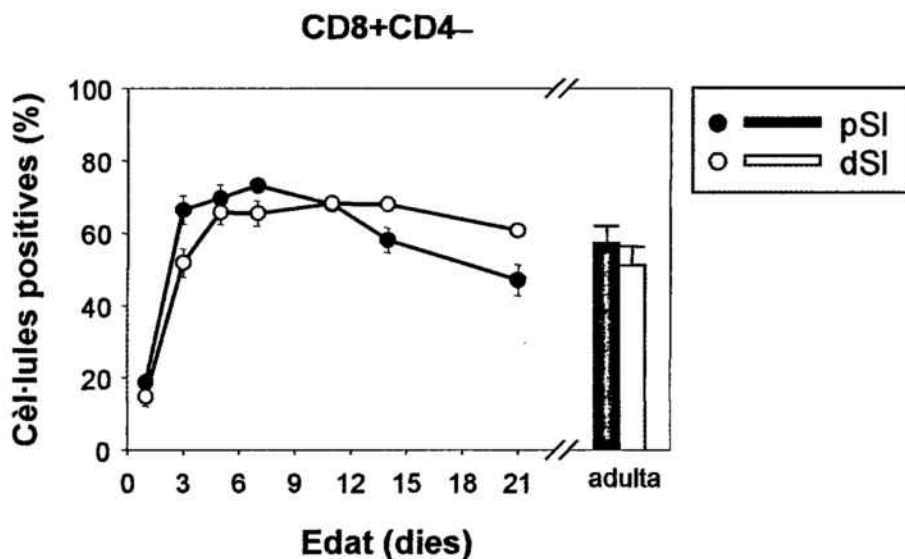


Figura 15

Percentatge de IEL CD8+CD4- durant el període de lactància i en rates adultes. Proporció d'IEL CD8+CD4- en relació al nombre total de IEL presents en la finestra d'adquisició per mostres intestí prim proximal i distal (pSI i dSI, respectivament). Els resultats s'expressen com a mitjana \pm EEM de 4-8 valors, cadascun procedent de 2-4 animals agrupats segons l'edat.

De la mateixa manera, s'ha detectat una elevada proporció de IEL DN el dia de naixement (Figura 16). Aquest percentatge es manté al voltant del 30% en relació a la població total de IEL i és superior al corresponent en animals adults ($p < 0,001$).

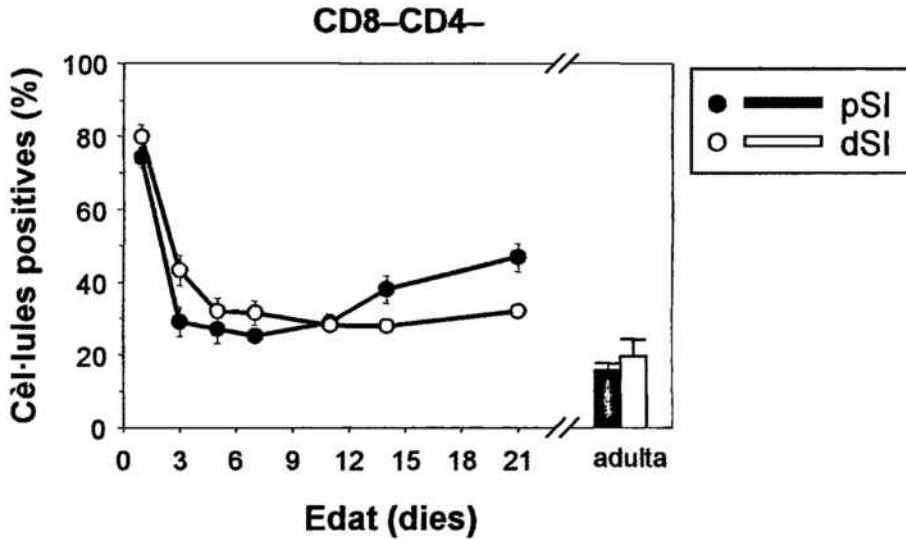


Figura 16

Percentatge de IEL DN durant el període de lactància i en rates adultes. Proporció de IEL CD8-CD4- en relació al nombre total de IEL presents en la finestra d'adquisició per a mostres d'intestí prim proximal i distal (pSI i dSI, respectivament). Els resultats s'expressen com a mitjana \pm EEM de 4-8 valors, cadascun procedent de 2-4 animals agrupats segons l'edat.

Pel que fa al percentatge de IEL CD8-CD4+ (Figura 17), aquest és relativament baix, en ambdues porcions intestinals, durant la primera i segona setmana postnatal, i presenta un clar increment durant la tercera setmana ($p < 0,05$). El dia del deslletament, la proporció d'aquesta subpoblació de IEL assoleix els nivells d'adult en el pSI (6%) però no en el dSI, on és inferior l'establert en l'edat adulta (11%) ($p < 0,05$). En rates adultes, la proporció de IEL CD4+CD8- és superior en el dSI respecte el pSI ($p < 0,05$).

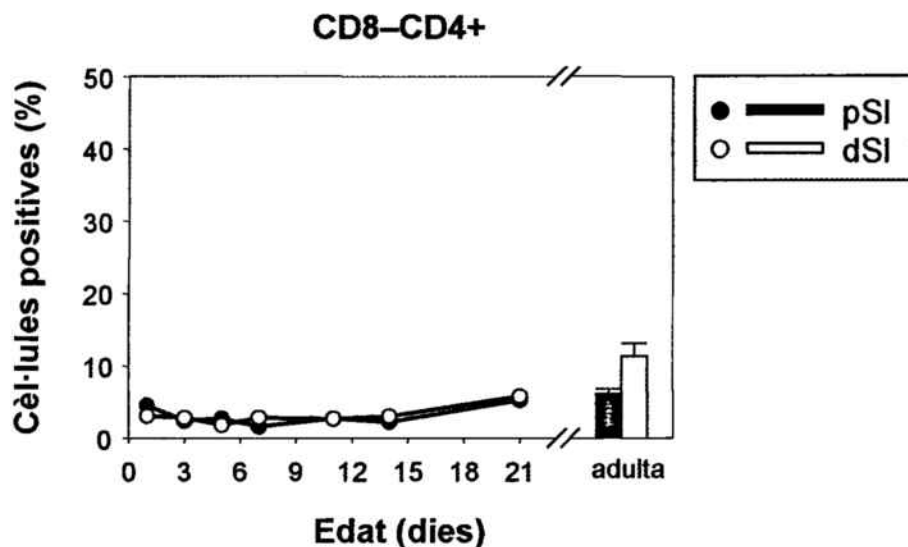


Figura 17

Percentatge de IEL CD4+CD8- durant el període de lactància i en rates adultes. Proporció de IEL CD4+CD8- en relació al nombre total de IEL presents en la finestra d'adquisició per a mostres intestí prim proximal i distal (pSI i dSI, respectivament). Els resultats s'expressen com a mitjana \pm EEM de 4-8 valors, cadascun procedent de 2-4 animals agrupats segons l'edat.

Durant tot el període de lactància, només una petita proporció de IEL són DP, és a dir, expressen les molècules CD8 i CD4 (<3%) (Figura 18). Pel contrari, el fenotip CD8+CD4+ està present com a mínim en un 18% de IEL intestinals en l'edat adulta, no observant-se diferències significatives entre les dues porcions estudiades.

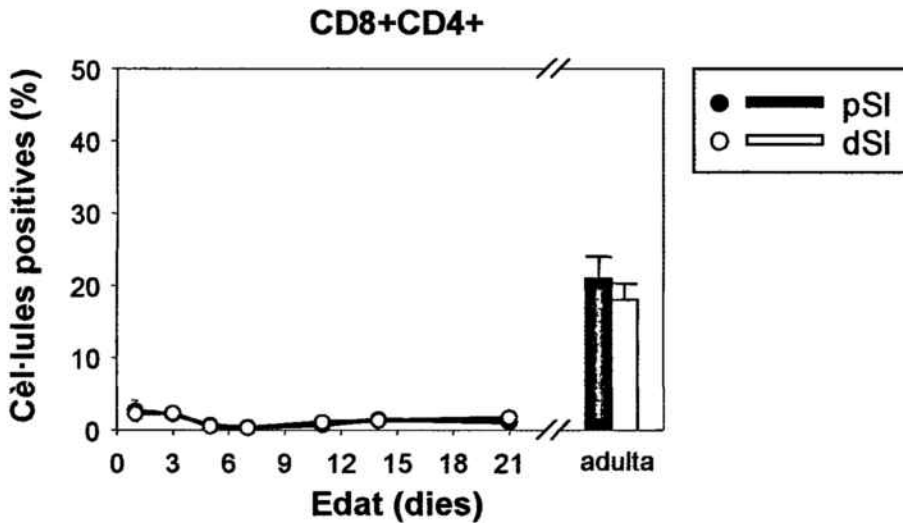


Figura 18

Percentatge de IEL DP durant el període de lactància i en rates adultes. Proporció de IEL CD8+CD4+ en relació al nombre total de IEL presents en la finestra d'adquisició per a mostres d'intestí prim proximal i distal (pSI i dSI, respectivament). Els resultats s'expressen com a mitjana \pm EEM de 4-8 valors, cadascun procedent de 2-4 animals agrupats segons l'edat.

2.4. CANVIS EN LES SUBPOBLACIONS DE IEL CD8+ DURANT EL PERÍODE DE LACTÀNCIA

Mitjançant la tècnica de doble marcatge s'ha establert la cinètica d'aparició de diversos fenotips de IEL CD8+. Els resultats s'expressen com a percentatge de les diferents subpoblacions en relació a la població total de IEL CD8+.

Respecte a la molècula dímera CD8, existeixen dues subpoblacions segons les cadenes que formen aquest coreceptor: CD8 $\alpha\alpha$ i CD8 $\alpha\beta$. Les proporcions d'aquestes dues subpoblacions mostren fluctuacions i no s'observen canvis significatius durant el període de lactància ni entre els dos fragments intestinals (Figura 19). Aquests percentatges són similars als corresponents als animals adults. El fenotip CD8 $\alpha\alpha$ sempre domina sobre el fenotip CD8 $\alpha\beta$ i, en el cas de rates adultes, la proporció de IEL CD8 $\alpha\alpha$ + és de tres o dos vegades superior que la de IEL CD8 $\alpha\beta$ + en el pSI i en el dSI, respectivament.

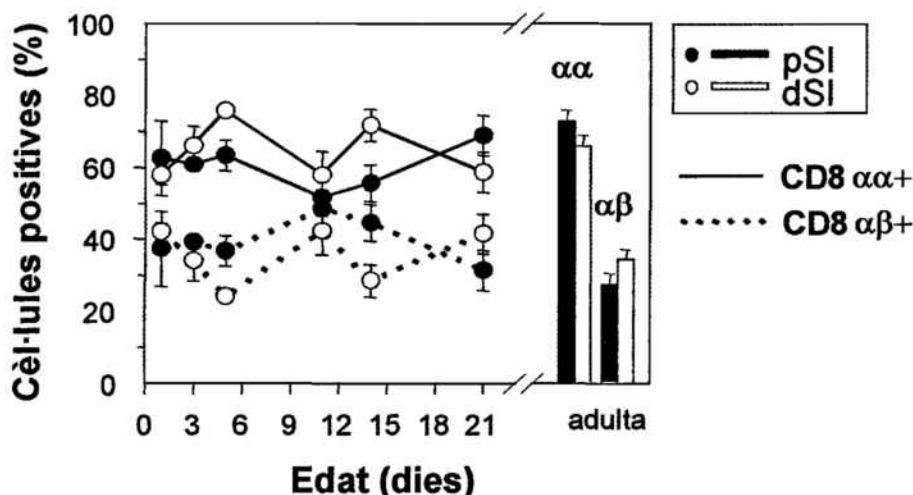


Figura 19

Desenvolupament de les subpoblacions CD8 $\alpha\alpha$ + i CD8 $\alpha\beta$ + durant el període de lactància i en rates adultes. El percentatge de cèl·lules positives es refereix a IEL CD8+ en intestí proximal i distal (pSI i dSI, respectivament). Els resultats s'expressen com a mitjana \pm EEM de 4-8 valors, cadascun procedent de 2-4 animals agrupats segons l'edat.

L'anàlisi del fenotip TCR $\alpha\beta$ en IEL CD8+ durant el període de lactància (Figura 20A) demostra una influència significativa de l'edat i de la porció intestinal considerada ($p < 0,001$). La proporció de cèl·lules que presenten la molècula TCR $\alpha\beta$ en IEL CD8+ és baixa el dia de naixement (18 i 30% en pSI i dSI, respectivament) però incrementa progressivament fins al dia 11 en ambdós fragments. Al final del període de lactància, la proporció en pSI és encara inferior a la d'animals adults ($p < 0,05$). El percentatge de cèl·lules TCR $\alpha\beta$ + en IEL CD8+ és significativament superior en el dSI respecte el pSI durant la primera setmana de vida ($p < 0,05$).

El percentatge de limfòcits TCR $\gamma\delta$ + en IEL CD8+ varia significativament durant el període de lactància ($p < 0,001$) (Figura 20B). Aquesta proporció disminueix durant la primera setmana de vida i incrementa posteriorment, especialment en el dSI. La proporció de cèl·lules TCR $\gamma\delta$ + en IEL CD8+ és significativament superior en el dSI que en el pSI els dies 1 i 21 ($p < 0,05$). El dia de deslletament, els IEL TCR $\gamma\delta$ + en ambdós fragments no representen més del 15% dels limfòcits CD8+ o 11% del total de IEL. Aquests valors no difereixen dels corresponents a l'edat adulta.

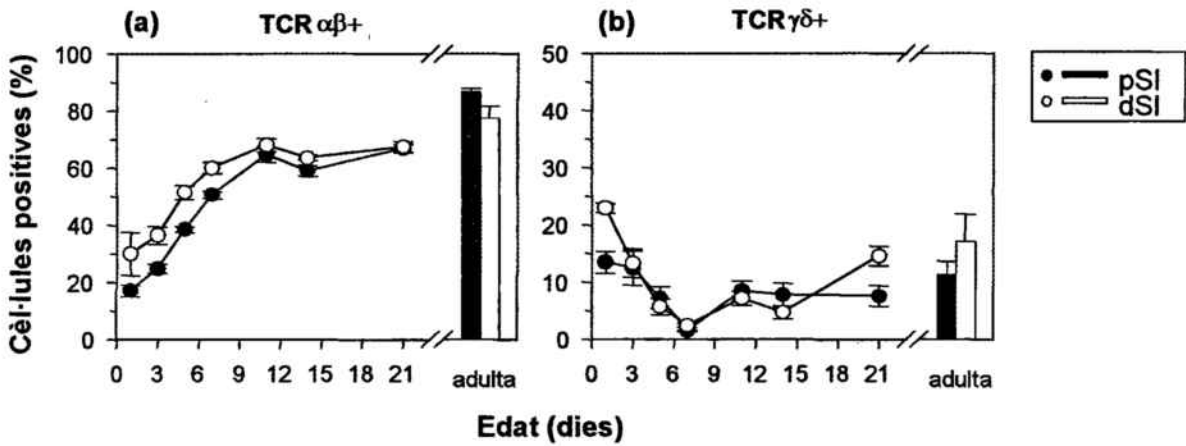


Figura 20

Desenvolupament de les subpoblacions CD8+TCR $\alpha\beta$ + i CD8+TCR $\gamma\delta$ + durant el període de lactància i en rates adultes. Percentatge de (A) CD8+TCR $\alpha\beta$ + i (B) CD8+TCR $\gamma\delta$ + en IEL CD8+ en intestí proximal i distal (pSI i dSI, respectivament). Els resultats s'expressen com a mitjana \pm EEM de 4-8 valors, cadascun procedent de 2-4 animals agrupats segons l'edat.

L'edat i la porció intestinal considerada influeixen significativament en l'evolució de la proporció de IEL CD8+ que coexpressen NKR-P1A ($p < 0,001$) (Figura 21). La proporció de cèl·lules NK en IEL CD8+ disminueix a partir del dia 3 i fins el dia 21, tant en pSI com en dSI, encara que no s'arriben a assolir valors d'adult ($p < 0,05$). El percentatge de cèl·lules NK en IEL CD8+ és superior en el pSI que en el dSI durant l'interval de temps comprès entre els dies 3-7 ($p < 0,01$).

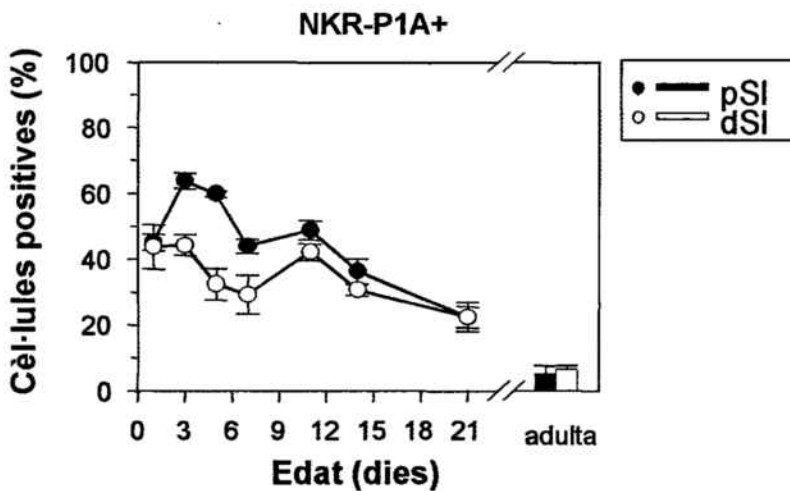


Figura 21

Desenvolupament de la subpoblació CD8+NKR-P1A+ durant el període de lactància i en rates adultes. El percentatge de cèl·lules positives es refereix a IEL CD8+ en intestí proximal i distal (pSI i dSI, respectivament). Els resultats s'expressen com a mitjana \pm EEM de 4-8 valors, cadascun procedent de 2-4 animals agrupats segons l'edat.

La Figura 22 resumeix els canvis relatius de les subpoblacions de IEL CD8+ que expressen els receptors mútuament excloents: NKR-P1A, TCR $\alpha\beta$ i TCR $\gamma\delta$ durant el període d'alletament. Tal i com es pot observar en ambdues porcions intestinals, el patró varia amb l'edat observant-se distribucions diferents durant les primeres 3 setmanes de vida, que també reflecteixen un patró diferent en comparació amb l'adult. En el pSI i el dSI, la proporció de IEL TCR $\alpha\beta$ +CD8+ incrementa amb l'edat a expenses de la subpoblació NKR-P1A+CD8+, mentre que el tipus cel·lular TCR $\gamma\delta$ +CD8+ disminueix durant la primera setmana de vida, assoleix un mínim el dia 7 i incrementa posteriorment. Els IEL CD8+ de rates adultes presenten la molècula TCR $\alpha\beta$ en més del 80% d'aquesta població, mentre que les molècules TCR $\gamma\delta$ i NKR-P1A s'expressen només en un 11-17% i 5-6%, respectivament.

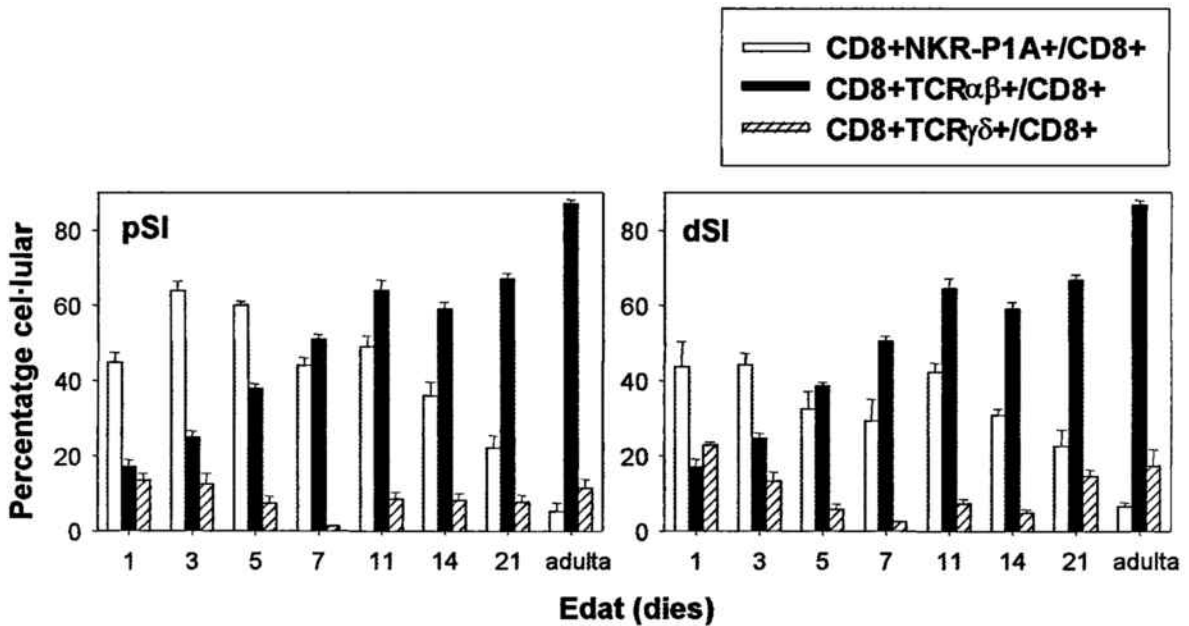


Figura 22

Proporcions de subpoblacions excloents de IEL CD8+ durant el període de lactància i a l'edat adulta. El percentatge de cèl·lules positives CD8+NKR-P1A+, IEL CD8+TCR $\alpha\beta$ +, i IEL CD8+TCR $\gamma\delta$ + es refereix al total de es CD8+ en intestí proximal i distal (pSI i dSI, respectivament). Els resultats s'expressen com a mitjana \pm EEM de 4-8 valors, cadascun procedent de 2-4 animals agrupats segons l'edat.

En relació a la molècula CD3 (Figura 23A), el dia de naixement, més de la meitat de IEL CD8+ coexpressen CD3 en el pSI (57%) i en el dSI (90%). En ambdós fragments, la proporció de cèl·lules CD3+ en IEL CD8+ incrementa gradualment des del dia 3 i durant tot el període de lactància ($p < 0,001$). El dia de deslletament i a l'edat adulta, més del 95% de IEL CD8+ presenten CD3. Considerant el període lactància, el percentatge de cèl·lules CD3+ en IEL

CD8+ és superior en el dSI respecte el pSI ($p < 0,001$). En base als resultats obtinguts del doble marcatge CD3/CD8 en rates adultes i considerant l'existència de IEL CD8+ que coexpressen CD4 a (Figura 18), la població CD8+CD4+ és CD3+.

En contrast al patró d'expressió de la molècula CD3, el marcador CD5 només es coexpressa en una població minoritària de IEL CD8+ en ambdós fragments intestinals. Durant el període de lactància, no s'observen diferències significatives entre les dues porcions (Figura 23B). A partir del dia 3 i durant les 3 primeres setmanes de vida, el percentatge de IEL CD5+ respecte el total de IEL CD8+ varia però sempre es manté inferior al 27%. El dia 21, aquesta proporció representa el 12% en ambdós fragments i és significativament inferior a la trobada en rates adultes ($p < 0,05$).

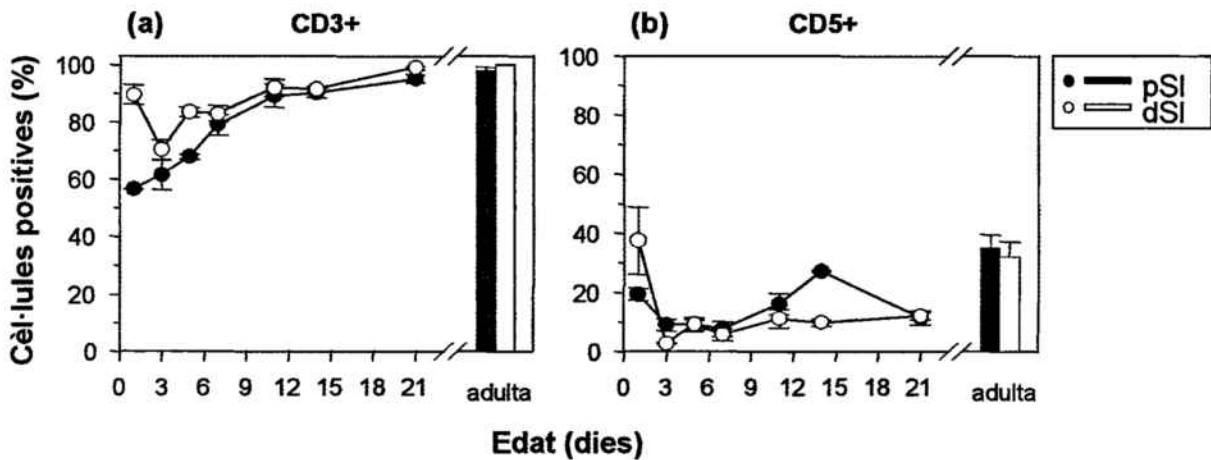


Figura 23

Desenvolupament de les subpoblacions CD8+CD3+ i CD8+CD5+ durant el període de lactància i en rates adultes. Percentatge de (A) CD8+CD3+ i (B) CD8+CD5+ en IEL CD8+ en intestí proximal i distal (pSI i dSI, respectivament). Els resultats s'expressen com a mitjana \pm EEM de 4-8 valors, cadascun procedent de 2-4 animals agrupats segons l'edat

El dia 1, aproximadament la meitat de IEL CD8+ del pSI i dSI expressen la molècula CD2 a la seva superfície. En canvi, des del dia 3, la majoria de IEL CD8+ són CD2- tant en pSI com en dSI en animals lactants i rates adultes (Figura 24A). No s'observen diferències significatives en el percentatge de cèl·lules CD2+ en IEL CD8+ ni en el pSI ni en el dSI o quan es comparen animals adults amb els corresponents al dia del deslletament.

La molècula Thy-1 (CD-90) en limfòcits T perifèrics desapareix després dels primers estadis de maduració. La Figura 24B mostra l'evolució de les cèl·lules CD90- respecte el total de IEL CD8+. L'anàlisi del doble marcatge CD90/CD8 en IEL durant el període de lactància mostra que els IEL CD8+ coexpressen CD90 només el dia de naixement (~30%) i després, fins i tot a l'edat adulta, gairebé el 100% dels IEL CD8+ són CD90- tant en el pSI com en el dSI.

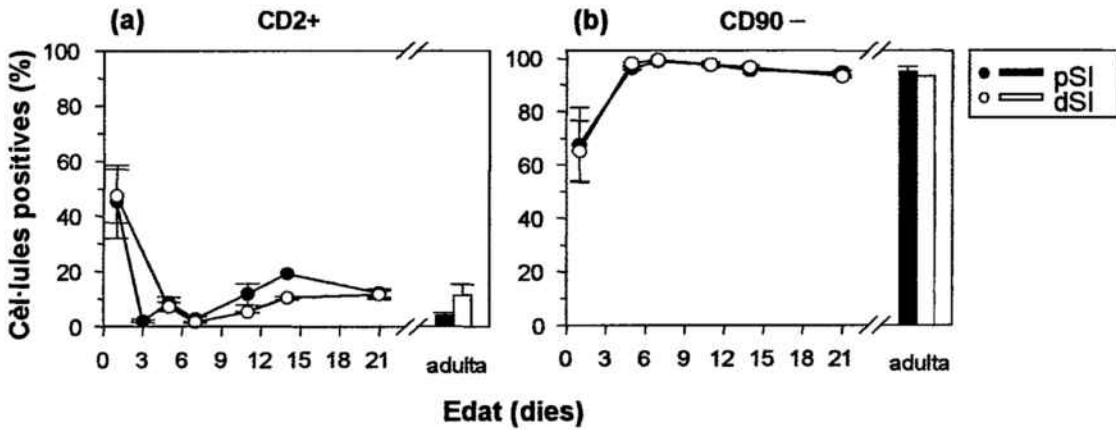


Figura 24

Desenvolupament de les subpoblacions CD8+CD2+ i CD8+CD90- durant el període de lactància i en rates adultes. Percentatge de (A) CD8+CD2+ i (B) CD8+CD90- en IEL CD8+ en intestí proximal i distal (pSI i dSI, respectivament). Els resultats s'expressen com a mitjana ± EEM de 4-8 valors, cadascun procedent de 2-4 animals agrupats segons l'edat.

La molècula CD44 és un receptor que participa en l'adhesió mucosal de les cèl·lules T a la mucosa intestinal i permet diferenciar les cèl·lules memòria (CD44^{high}) de les verge (CD44^{low}). En rata adulta, hi ha una elevada expressió de CD44 en IEL CD8+, però amb proporcions ben diferents en el pSI i el dSI (42% i 60%, respectivament, p<0,05) (Figura 25). Durant el període de lactància, la proporció de CD44^{high} en IEL CD8+ és similar a la de rates adultes.

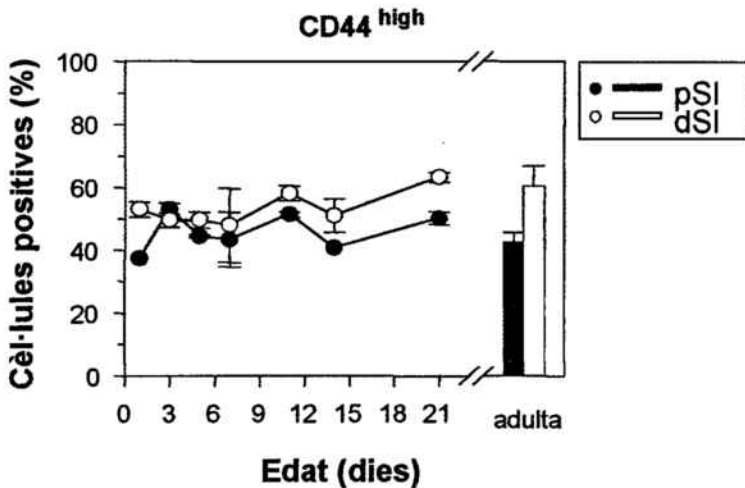


Figura 25

Desenvolupament de la subpoblació CD8+ CD44+ durant el període de lactància i en rates adultes. El percentatge de cèl·lules positives es refereix a IEL CD8+ en intestí proximal i distal (pSI i dSI, respectivament). Els resultats s'expressen com a mitjana ± EEM de 4-8 valors, cadascun procedent de 2-4 animals agrupats segons l'edat.

Tot i que per definició, els IEL són limfòcits activats, l'estudi realitzat en animals adults indica que no hi ha, o bé només una petita part de IEL CD8+, coexpressen molècules d'activació com CD25 (receptor per a IL-2), CD45RC (implicat en la transducció del senyal estimulador) i CD71 (receptor per a la transferrina). A més a més, aquestes molècules de superfície no s'expressen en IEL corresponents al període de lactància. D'altra banda, donat l'efecte coestimulador de la molècula CD28, es va estudiar la seva presència en IEL de rates lactants, i es va observar una manca en la seva expressió.

2.5. CANVIS EN ELS FENOTIPS DELS IEL CD4+ DURANT EL PERÍODE DE LACTÀNCIA I RATES ADULTES

Tot i que els IEL CD4+ representen una població minoritària en rates lactants, es va caracteritzar el seu fenotip durant aquest període i edat adulta. El dia del naixement més de la meitat de IEL CD4+ coexpressen CD3 (Figura 26A), i aquesta molècula està present en més del 80% de IEL CD4+ en el pSI i el dSI al final del període de lactància, encara que en el pSI no assoleix el percentatge observat en animal adult ($p < 0,05$). Donat que en rata adulta més del 99% de IEL CD4+ presenten la molècula CD3, i considerant els resultats obtinguts del doble marcatge amb CD8/CD3, es pot afirmar que tots els IEL CD8+CD4+ coexpressen CD3 en l'edat adulta.

Tot i que la molècula CD5 està present en una petita proporció de IEL CD4+ els primers dies de vida, aquest percentatge incrementa durant tot el període de lactància (Figura 26B). El dia 21, aquesta proporció encara és inferior a la corresponent rata adulta ($p < 0,05$ en pSI). En animals adults tots els IEL CD4+ coexpressen la molècula CD5, incloent per tant la població DP (CD8+CD4+).

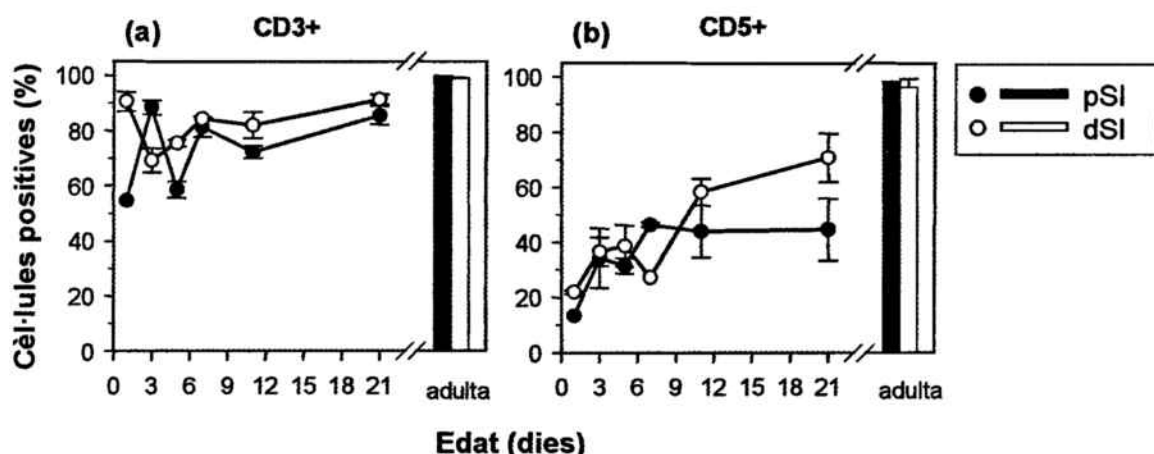


Figura 26

Desenvolupament de les subpoblacions CD4+CD3+ i CD4+CD5+ durant el període de lactància i en rates adultes. Percentatge de (A) CD4+CD3+ i (B) CD4+CD5+ en IEL CD4+ en intestí proximal i distal (pSI i dSI, respectivament). Els resultats s'expressen com a mitjana ± EEM de 4-8 valors, cadascun procedent de 2-4 animals agrupats segons l'edat

La majoria de IEL CD4+ (~90%) ja presenten la molècula d'adhesió CD2 el dia de naixement (Figura 27). Aquesta proporció disminueix marcadament els primers 5 dies de vida fins a assolir un 30% i 40% en dSI i pSI, respectivament. En el pSI aquest percentatge es manté similar fins al final del període de lactància però, en canvi, en el dSI incrementa fins a gairebé un 80%. A l'edat adulta, en ambdues porcions intestinals, només uns 25% de limfòcits CD4+ coexpressen CD2.

De forma paral·lela al la població de IEL CD8+, els IEL CD4+ procedents de rates lactants o s adultes no expressen les molècules CD25, CD71 o CD28.

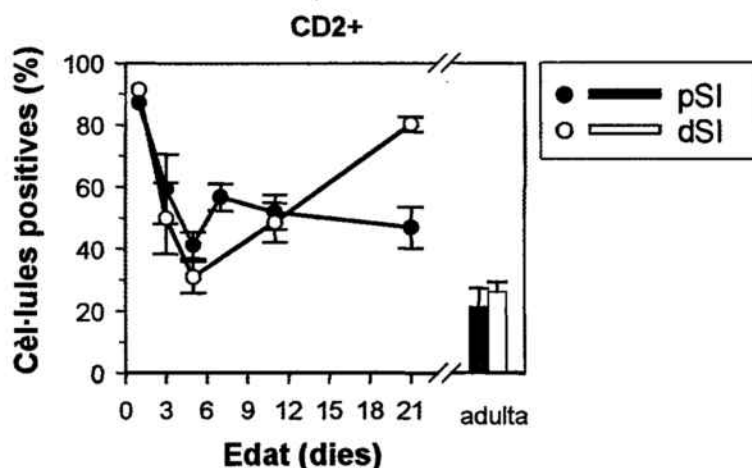


Figura 27

Desenvolupament de la subpoblació CD4+CD2+ durant el període de lactància i en rates adultes. El percentatge de cèl·lules positives es refereix a IEL CD4+ en intestí proximal i distal (pSI i dSI, respectivament). Els resultats s'expressen com a mitjana ± EEM de 4-8 valors, cadascun procedent de 2-4 animals agrupats segons l'edat.

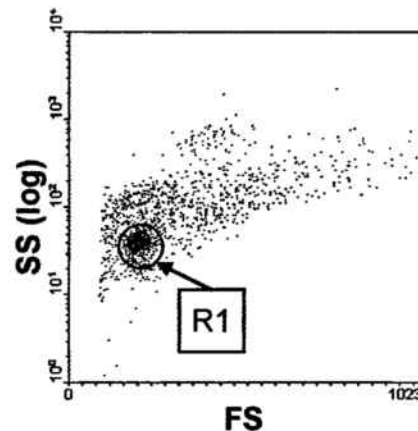
3. CARACTERITZACIÓ FENOTÍPICA DE LIMFÒCITS DE LA LÀMINA PRÒPIA D'INTESTÍ PRIM DE RATA DURANT EL PERÍODE DE LACTÀNCIA

3.1. DETERMINACIÓ DE LA FINESTRA D'ADQUISICIÓ LIMFOCÍTICA I DE LIMFÒCITS CD45+ A PARTIR DE LES CÈL·LULES DE LA LÀMINA PRÒPIA

Per a l'estudi del fenotip de limfòcits de la làmina pròpia (LPL), es va seleccionar la finestra d'adquisició en els citogrames FSC/SSC mitjançant el marcatge amb AcMo anti-TCR $\alpha\beta$ i anti-CD45RA de suspensions cel·lulars de làmina pròpia obtingudes de rates de 21 dies i adultes. La Figura 28 mostra un citograma representatiu de LPL de rata adulta on s'assenyala la finestra R1 establerta per a la selecció de LPL.

Figura 28

Citograma representatiu obtingut d'una suspensió de cèl·lules de làmina pròpia d'ili d'animals adults, on es mostra la finestra d'adquisició limfocítica R1.



A la Figura 29A s'observa un histograma representatiu corresponent a l'expressió de la molècula CD45+ en la població limfocítica seleccionada (R1). L'evolució de cèl·lules CD45+ dins d'aquesta finestra durant el període de lactància i en animals adults es mostra en la Figura 29B. Com es pot observar en animals adults, la molècula CD45 està present en un 95% dels limfòcits inclosos en R1. En canvi, el dia de naixement només un 35% de les cèl·lules de la finestra presenten la molècula CD45. La proporció de LPL CD45+ incrementa durant tot el període lactància ($p < 0,001$), sobretot durant les dues primeres setmanes de vida, de forma que el dia 14, el marcador CD45 està present en pràcticament el 90% de les cèl·lules incloses en la finestra d'adquisició. Al final del període de lactància, el percentatge de LPL CD45+ és encara inferior al corresponent a l'edat adulta ($p < 0,05$).

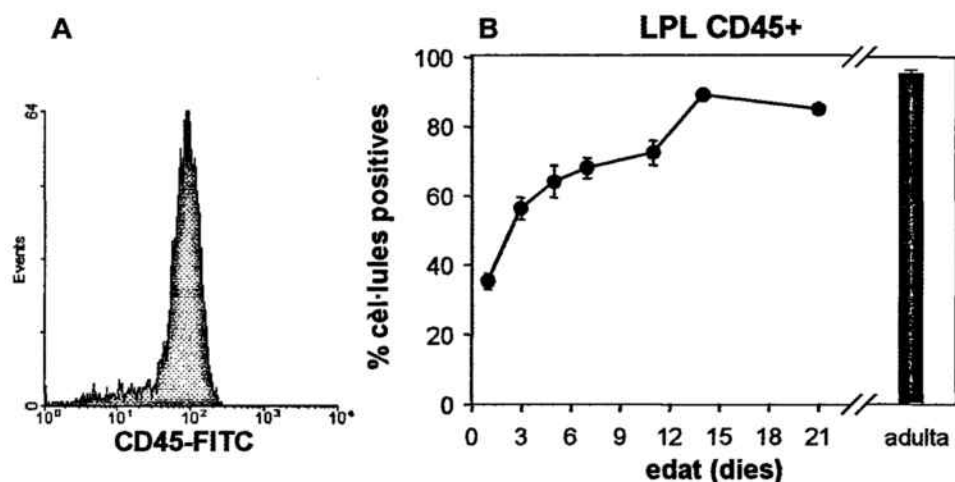


Figura 29

(A) Histograma representatiu obtingut mitjançant el marcatge de LPL de rata adulta amb AcMo anti-CD45 en la finestra R1. (B) Evolució del percentatge de cèl·lules CD45+ a la finestra R1. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm EEM de 4-8 valors, cadascun procedent d'un animal o de 2-4 animals agrupats en funció de l'edat.

3.2. DESENVOLUPAMENT DE LIMFÒCITS B I CÈL·LULES SIGA+ EN LP DURANT EL PERÍODE DE LACTÀNCIA

Els limfòcits B presents a LP s'ha determinat en funció de l'expressió a la seva superfície de la molècula CD45RA, sig (cadena α) i sigA (cadena β). El percentatge de cèl·lules CD45RA+ (Figura 30A) i de sig+ (Figura 30B) durant el període de lactància mostra una expressió paral·lela d'ambdues molècules, que presenten una evolució positiva depenent de l'edat ($p < 0,001$). En ambdós casos, durant les dues primeres setmanes de vida, el percentatge de cèl·lules positives no representa més del 15% de les cèl·lules seleccionades, però aquest percentatge augmenta marcadament durant la tercera setmana de vida, assolint valors similars al dels adults (~35%) el dia del deslletament.

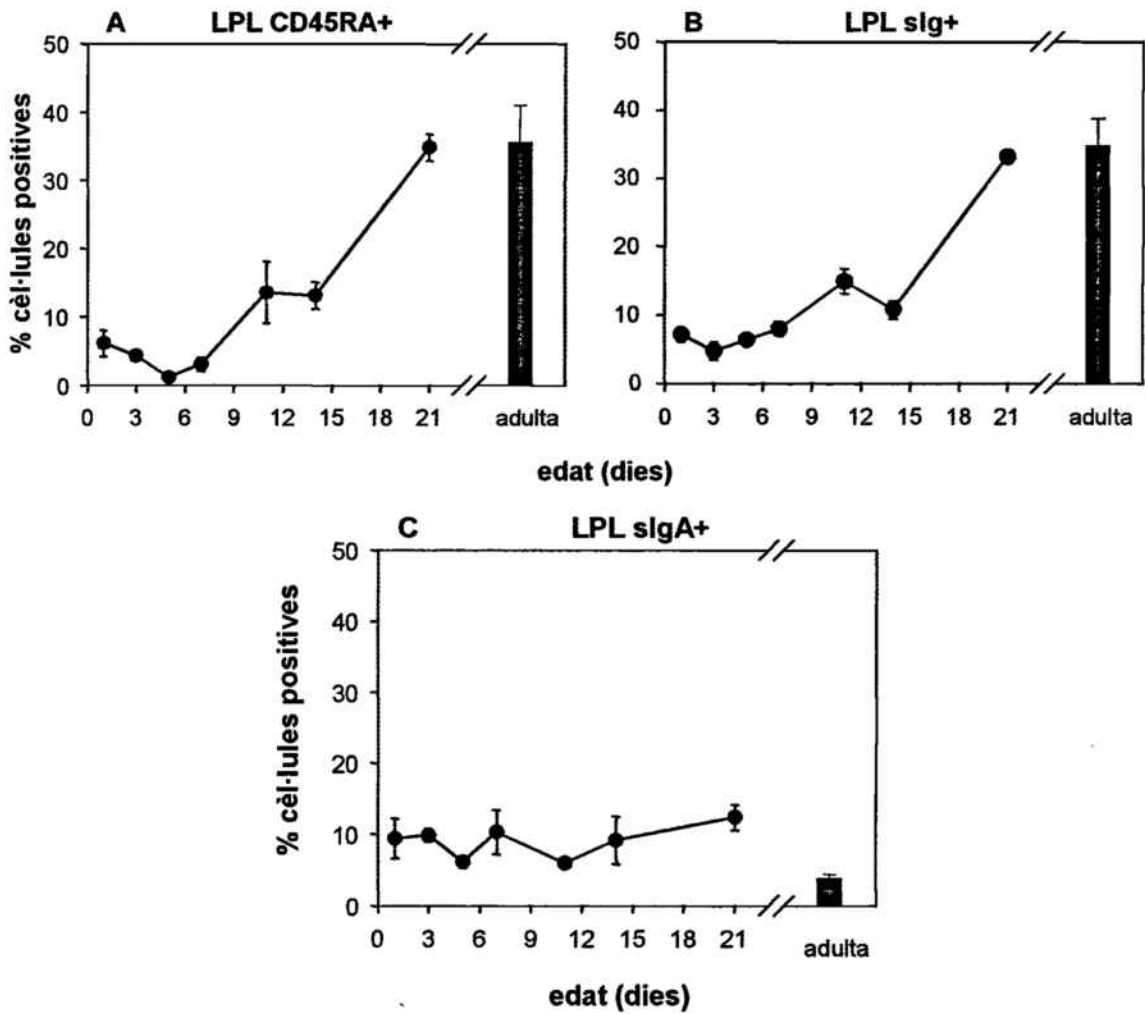


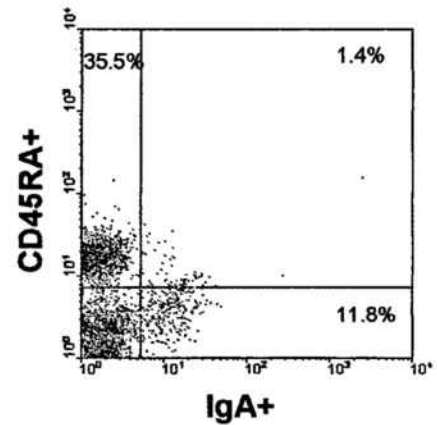
Figura 30:

Percentatge de cèl·lules CD45RA+ (A), slg+ (B), slgA+ (C) en LPL d'ili durant el període de lactància i en animals adults. Els resultats s'expressen com mitjana \pm EEM de 4-8 valors, cadascun procedent d'un animal o de 2-4 animals agrupats en funció de l'edat.

La proporció de cèl·lules slgA+ en la regió limfocítica (R1) representa un 10% (Figura 30C), i no varia significativament durant el període de lactància, encara que en animals adults aquesta proporció és inferior al 4% ($p < 0,05$ adult respecte dia 21). Mitjançant doble marcatge es pot observar que les cèl·lules CD45RA+ localitzades en la regió R1, no expressen slgA (Figura 31).

Figura 31

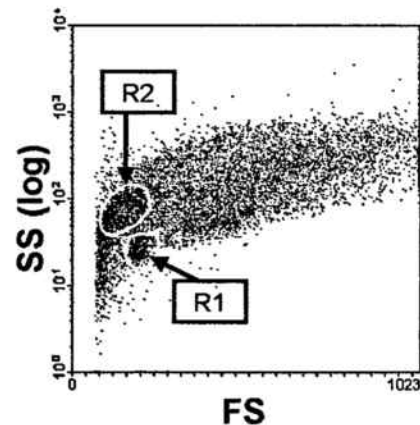
Citograma biparamètric representatiu CD45RA/sIgA obtingut a partir d'una suspensió de LPL corresponent a un animal de 21 dies d'edat.



En estudiar l'expressió de sIgA fora d'aquesta finestra d'adquisició es va constatar l'existència d'una població cel·lular positiva per aquest marcador definida amb un patró FSC/SSC diferent -cèl·lules més granulars- a l'establert per limfòcits, que es va designar com a regió R2 (Figura 32). Aquesta població cel·lular pot correspondre a formes blàstiques de cèl·lules B o a cèl·lules plasmàtiques diferenciades (Farstad i col., 2000).

Figura 5

Citograma representatiu obtingut de les cèl·lules de LP d'ili d'animals adults on es mostra la finestra R1 (considerada per als limfòcits) i la finestra R2 (on abunden les cèl·lules sIgA+).



Dins d'aquesta regió R2, es van establir els percentatges de cèl·lules sIgA+ i/o CD45RA+ durant el període de lactància i en rata adulta (Taula 8). Com es pot observar, existeixen cèl·lules sIgA+ des del dia del naixement tot i que la seva expressió es molt baixa (Figura 33A). A partir de la primera setmana de vida, les cèl·lules sIgA+ són més abundants en la LP i preenten un augment en l'expressió d'aquesta molècula a la seva superfície (Figura 33B). El dia 21, la proporció de cèl·lules sIgA+ en la regió R2 (Taula 8) arriba a valors representatius d'edat adulta (60%). D'aquestes cèl·lules, només una petita fracció coexpressa CD45RA (Figura 33C, Taula 8).

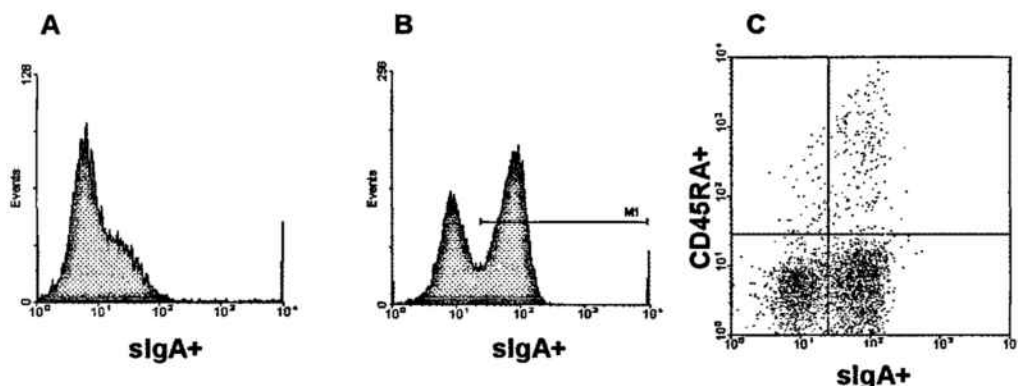


Figura 6

Característiques citomètriques de les cèl·lules slgA+. (A) Histograma representatiu on es mostra la intensitat de fluorescència de les cèl·lules slgA+ en R2 a la LP de l'ili d'una rata d'11 dies; (B) Histograma representatiu que mostra la intensitat de fluorescència de les cèl·lules slgA+ en R2 a la LP de l'ili d'una rata de 21 dies; (C) citograma biparamètric corresponent al doble marcatge slgA/CD45RA a la finestra R2.

Taula 8

Evolució de cèl·lules slgA+ i/o CD45RA+ a LP d'ili de rates lactants i d'animals adults. El percentatge de cèl·lules positives es refereix a les cèl·lules incloses en R2 (Figura 32). Es resultats s'expressen com a mitjana ± EEM (nombre de valors derivats d'animals agrupats entre 1-4 segons l'edat).

edat	cèl·lules slgA+	cèl·lules CD45RA+	cèl·lules slgA+CD45RA+
dia 1	12.00 ± 6.67 (5)	9.60 ± 4.21 (5)	9.60 ± 4.21 (5)
dia 3	25.67 ± 3.62 (9)	12.11 ± 2.25 (9)	11.44 ± 2.12 (9)
dia 5	18.67 ± 3.81 (6)	5.08 ± 2.99 (6)	4.08 ± 1.99 (6)
dia 7	32.75 ± 6.26 (4)	10.50 ± 1.32 (4)	10.00 ± 1.47 (4)
dia 11	26.50 ± 3.88 (4)	8.67 ± 1.33 (4)	8.67 ± 1.33 (4)
dia 14	36.00 ± 8.50 (4)	6.38 ± 0.94 (4)	6.50 ± 0.87 (4)
dia 21	60.33 ± 3.71 (4)	3.17 ± 0.44 (4)	3.17 ± 0.44 (4)
Adulta	57.40 ± 6.72 (5)	6.56 ± 1.55 (5)	6.56 ± 1.55 (5)

3.3. DESENVOLUPAMENT DE LES SUBPOBLACIONS DE LPL CD4+

A la **Figura 34** s'observa que el percentatge de LPL CD4+ des del naixement i durant el període de lactància es modifica en funció de l'edat ($p < 0,001$). Aquesta és inferior al 10% durant els primers 7 dies de vida i incrementa fins a un 15% durant la segona i tercera setmana, percentatge que encara és inferior al d'animals adults ($p < 0,01$), que és de l'ordre del 60%.

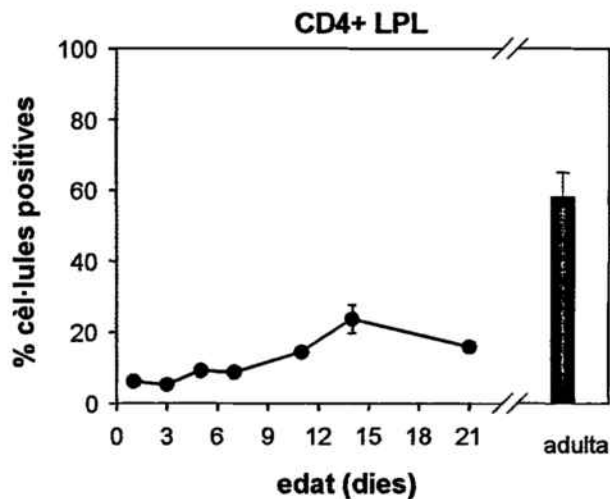


Figura 34

Evolució de LPL CD4+ durant el període de lactància i en animals adults. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm EEM de 4-8 valors, cadascun procedent d'un animal o de 2-4 animals agrupats en funció de l'edat.

L'anàlisi del fenotip de la molècula CD3 en LPL de tipus CD4+ (**Figura 35A**) posa de manifest que gairebé tot els LPL CD4+ coexpressen CD3 independentment de l'edat.

La presència de TCR $\alpha\beta$ en LPL CD4+ durant el període de lactància (**Figura 35B**) depèn de l'edat ($p < 0,01$). Així aquesta subpoblació representa un 60-70% els dies 1-3, assoleix més d'un 80% el dia 5 i roman constant durant la resta del període de lactància. El dia 21, aquesta proporció és encara inferior a la de rata adulta ($p < 0,05$). Aquest comportament edat-dependent és similar a l'observat en l'aparició de la molècula d'adhesió CD2 en els LPL CD4+ (**Figura 35C**). A partir de la primera setmana i durant la resta del període estudiat, la molècula CD2 s'expressa en més d'un 85% de LPL CD4+.

La proporció de cèl·lules CD5+ en LPL CD4+ (**Figura 35D**) varia de forma bifàsica durant el període de lactància ($p < 0,001$). Així, durant la primera setmana postnatal, el percentatge

de cèl·lules CD5+ en LPL CD4+ és aproximadament d'un 65%, posteriorment incrementa fins al 85% i roman constant durant el període de lactància. El dia de deslletament no assoleix els valors observats en edat adulta, els quals representen gairebé un 100% ($p < 0,05$).

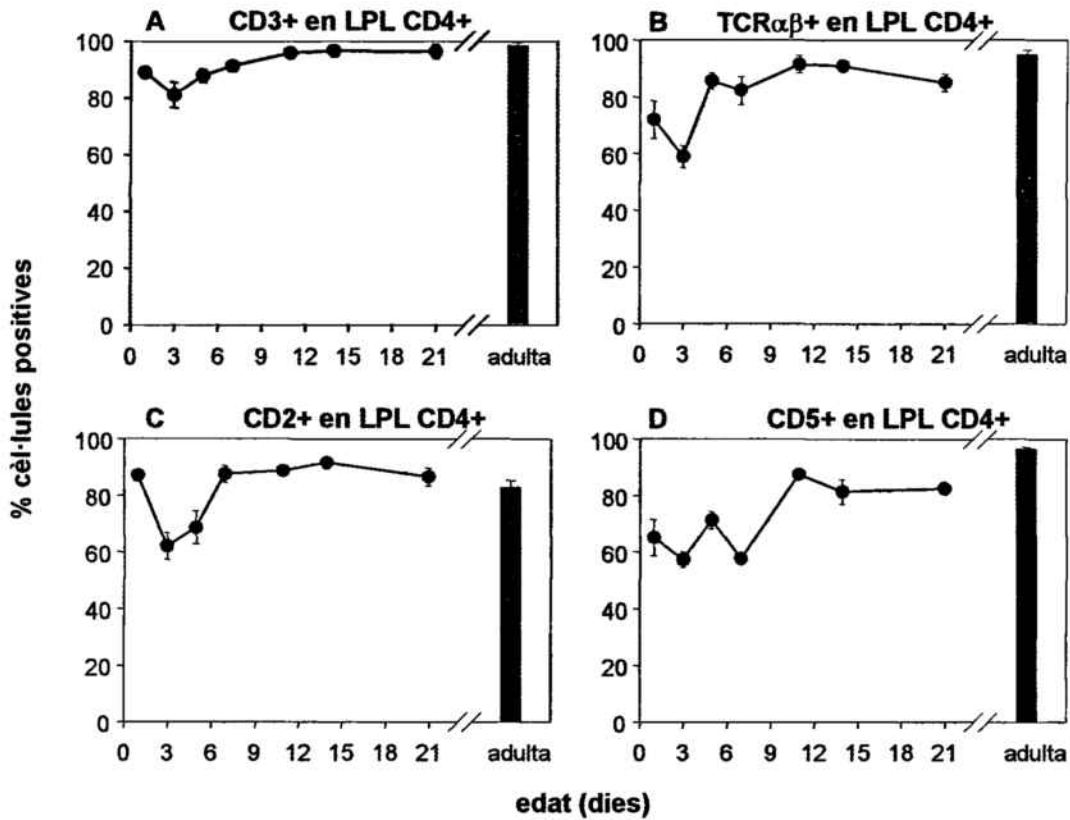


Figura 35

Evolució de les diferents subpoblacions de LPL CD4+ durant el període de lactància i en animals adults. Percentatge de cèl·lules (A) CD3+, (B) TCR $\alpha\beta$ +, (C) CD2+ i (D) CD5+ en LPL CD4+. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm EEM de 4-8 valors, cadascun procedent d'un animal o de 2-4 animals agrupats en funció de l'edat.

L'anàlisi de l'expressió de la molècula CD90 en LPL CD4+ (Figura 36A) disminueix a mida que augmenta l'edat de l'animal ($p < 0,001$). Un elevat percentatge de LPL CD4+ expressa CD90 els primers dies de vida. Aquest disminueix dramàticament durant la primera setmana de vida fins a valors entre 15-30%. En animals adults, només el 10% de LPL CD4+ són CD90+ ($p < 0,01$ respecte el dia 21).

Durant tot el període de lactància, una població minoritària de LPL CD4+ ($< 24\%$) expressa la molècula CD25 a la seva superfície (Figura 36B). En canvi, en rates adultes aquesta molècula està present en més del 65% de LPL CD4+ ($p < 0,01$, respecte el dia 21).

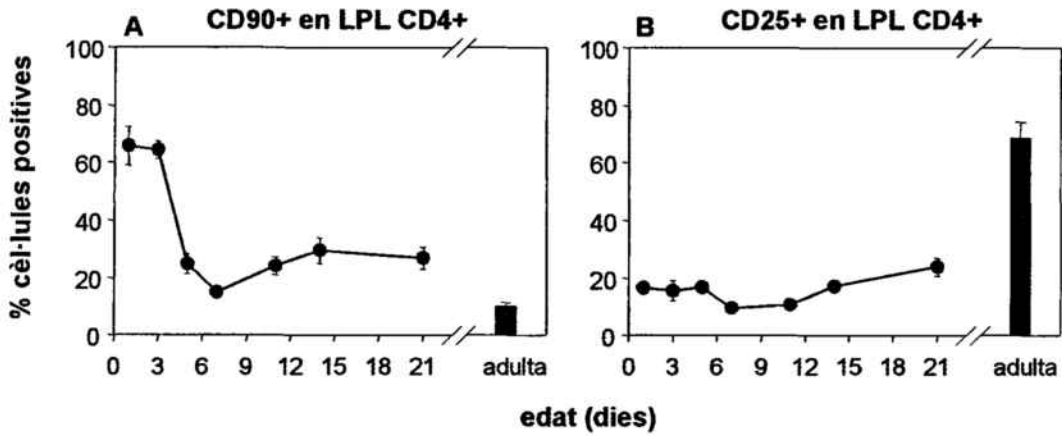


Figura 36

Evolució de diferents subpoblacions de LPL CD4+ durant el període de lactància i en animals adults. Percentatge de cèl·lules (A) CD90+ i (B) CD25+ en LPL CD4+. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm EEM de 4-8 valors, cadascun procedent d'un animal o de 2-4 animals agrupats en funció de l'edat.

3.4 DESENVOLUPAMENT DE LES SUBPOBLACIONS DE LIMFÒCITS CD8+ A LA LP

La proporció de cèl·lules CD8+ en la regió definida per a LPL en el citòmetre varia significativament durant el període de lactància ($p < 0,0001$) (Figura 37). A excepció del dia 1, les cèl·lules CD8+ representen al voltant d'un 40% de LPL durant les primeres setmanes de vida. Després, el percentatge disminueix fins a un 12-14% ($p < 0,0001$ dia 21 respecte el dia 14) i roman constant en animals adults.

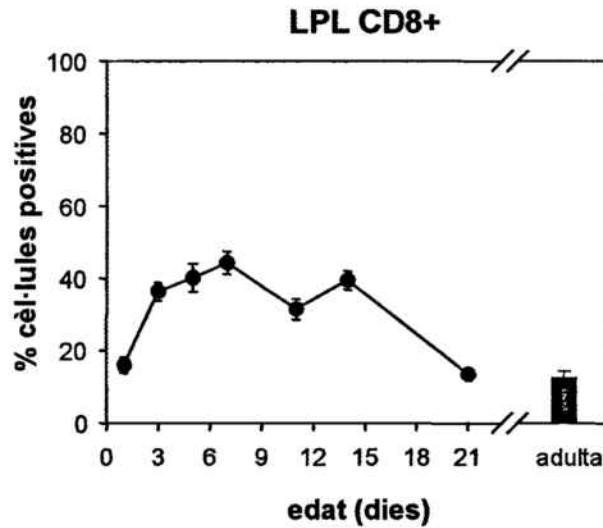


Figura 37

Evolució de LPL CD8+ durant el període de lactància i en animals adults. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm EEM de 4-8 valors, cadascun procedent d'un animal o de 2-4 animals agrupats en funció de l'edat.

Els limfòcits CD8+ de LP, a l'igual que els que es troben a nivell intraepitelial, presenten la molècula CD8 en forma d'homodímer $\alpha\alpha$ o com a heterodímer $\alpha\beta$. A la **Figura 38A** es mostra l'evolució d'ambdues poblacions complementàries dins de la totalitat de LPL CD8+. Aquests fenotips mostren fluctuacions depenents de l'edat durant el període de lactància ($p < 0,0001$): gairebé tots els LPL CD8+ són CD8 $\alpha\alpha$ + fins al dia 7, posteriorment el percentatge de cèl·lules CD8 $\alpha\beta$ + incrementa fins al dia 21 i a l'edat adulta, on s'assoleixen valors de 49 i 40%, respectivament.

A partir del dia del naixement, la proporció de limfòcits CD8+ que expressen la molècula CD3 (**Figura 38B**) supera al 80% i arriba fins a valors del 90% el dia 11 i posteriors.

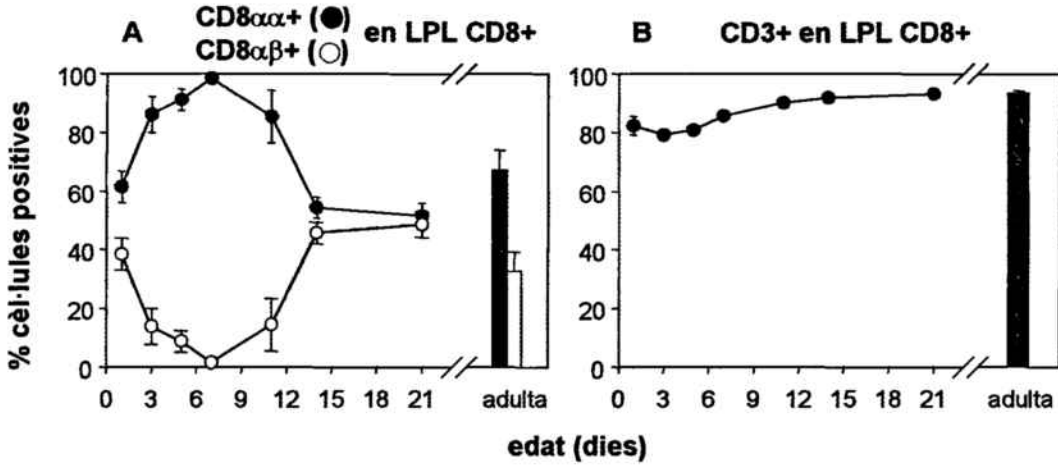


Figura 38

Evolució de diferents subpoblacions de LPL CD8+ durant el període de lactància i en animals adults. Percentatge de (A) cèl·lules CD8 $\alpha\alpha$ + i CD8 $\alpha\beta$ + i (B) CD3+ en els LPL CD8+. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm EEM de 4-8 valors, cadascun procedent d'un animal o de 2-4 animals agrupats en funció de l'edat.

D'altra banda, amb excepció del dia 1, la majoria de LPL CD8+ no expressen CD5 durant la primera setmana de vida (Figura 39A). A partir del dia 11, la proporció de CD5+ en LPL CD8+ incrementa ($p < 0,05$ dia 11 respecte el dia 7) i el dia 21, no difereix significativament del de rata adulta (~50%). L'evolució de la població CD8+CD5+ durant el període de lactància segueix un perfil paral·lel al de la població CD8 $\alpha\beta$ +.

Les Figures 39B i 39C resumeixen els canvis relatius en LPL CD8+ que expressen TCR $\alpha\beta$ i TCR $\gamma\delta$, ambdós amb un comportament dependent de l'edat durant el període de lactància ($p < 0,01$). El receptor TCR $\alpha\beta$ es troba present en un 40% de LPL CD8+ el dia 1, incrementa progressivament durant els primers 11 dies de vida, encara que a dia 21 (~65%) aquest percentatge no arriba a valors d'adult (~85%) ($p < 0,001$) (Figura 39B). El percentatge de LPL CD8+ amb TCR $\gamma\delta$ (Figura 39C) mostra fluctuacions (2-12%) durant les dues primeres setmanes de vida, i el dia 21, aquest percentatge és significativament superior al corresponent a animals adults ($p < 0,01$).

El desenvolupament de LPL CD8+ que expressen la molècula NKR-P1A (Figura 39D), presenta variacions en funció de l'edat durant el període de lactància. El dia de deslletament la proporció de cèl·lules NKR-P1A+ en LPL CD8+ assolix percentatges que no difereixen dels de l'edat adulta (~10%).

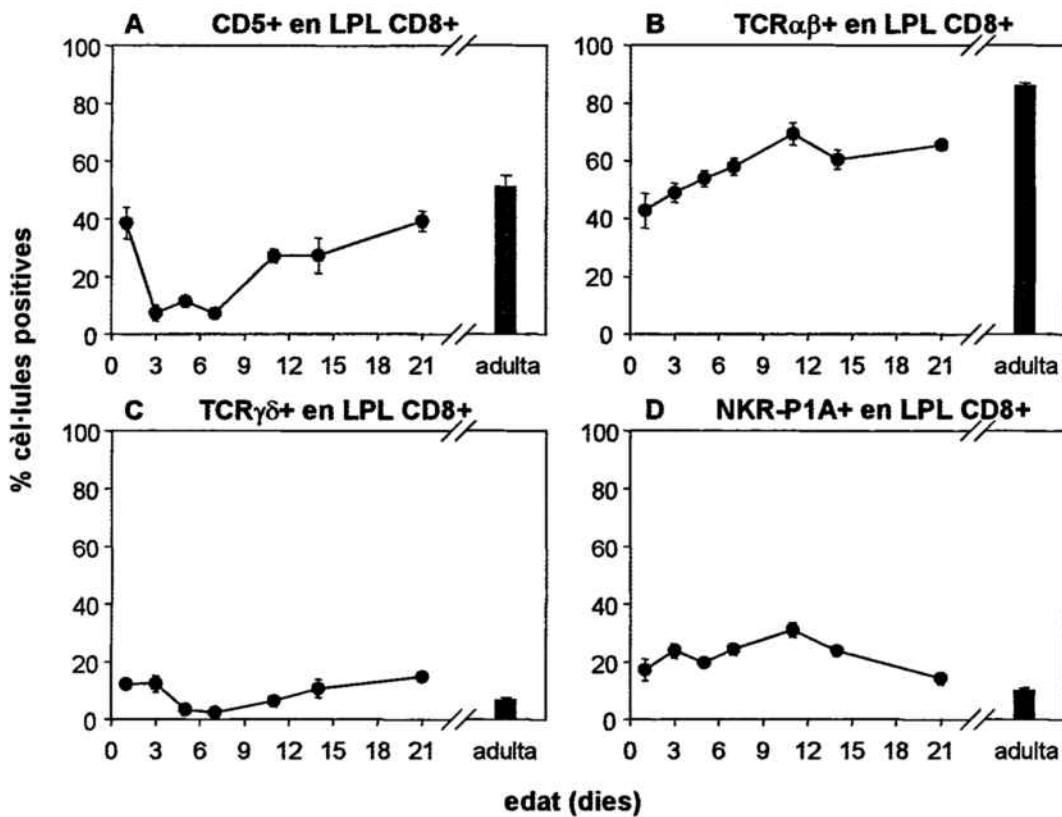


Figura 39

Evolució de diferents subpoblacions de LPL CD8+ durant el període de lactància i en animals adults. Percentatge de (A) cèl·lules CD5+, (B) TCR $\alpha\beta$ +, (C) TCR $\gamma\delta$ + i (D) NKR-P1A+ en els LPL CD8+. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm EEM de 4-8 valors, cadascun procedent d'un animal o de 2-4 animals agrupats en funció de l'edat.

En relació a la molècula CD90 (Figura 40A), el dia de naixement més del 40% de LPL CD8+ expressen aquesta molècula; aquesta proporció disminueix durant la primera setmana de vida ($p < 0,0001$ dia 7 respecte el dia 1) i incrementa durant la tercera setmana d'edat, assolint valors propis d'animal adult el dia de deslletament (20%).

De forma paral·lela als LPL CD4+, durant el període de lactància, només una població minoritària de LPL CD8+ expressa CD25 (Figura 40B) encara que en rata adulta aquesta població supera al 80% ($p < 0,01$, animal adult respecte el dia 21).

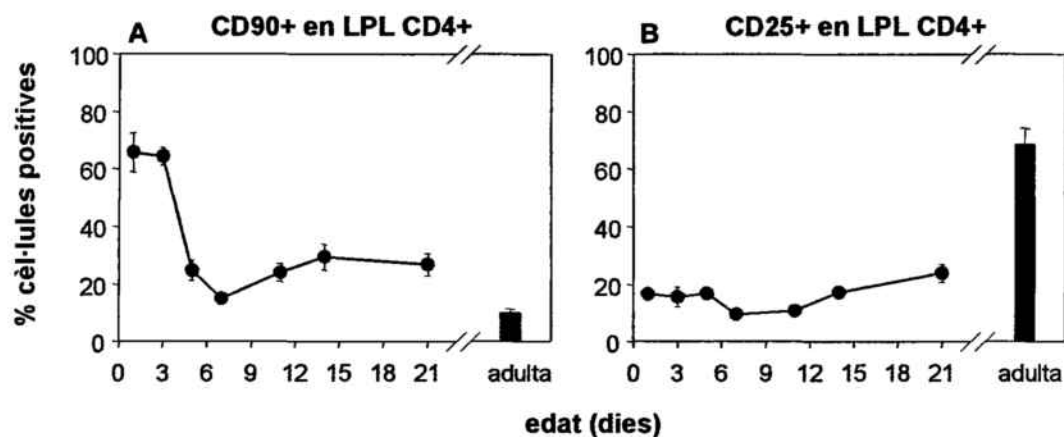


Figura 40

Evolució de diferents sub poblacions de LPL CD8+ durant el període de lactància i en animals adults. Percentatge de (A) cèl·lules CD90+ i (B) CD25+ en els LPL CD8+. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm EEM de 4-8 valors, cadascun procedent d'un animal o de 2-4 animals agrupats en funció de l'edat.

3.5. DESENVOLUPAMENT DE LES SUBPOBLACIONS DE CÈL·LULES NK EN LP

El percentatge de cèl·lules NK a LP d'ili d'animals lactants (Figura 41), determinat per la expressió de NKR-P1A, varia entre un 8 i un 20% durant les dues primeres setmanes d'edat. Posteriorment, aquest percentatge disminueix i representa únicament un 4% dels LPL a l'edat adulta.

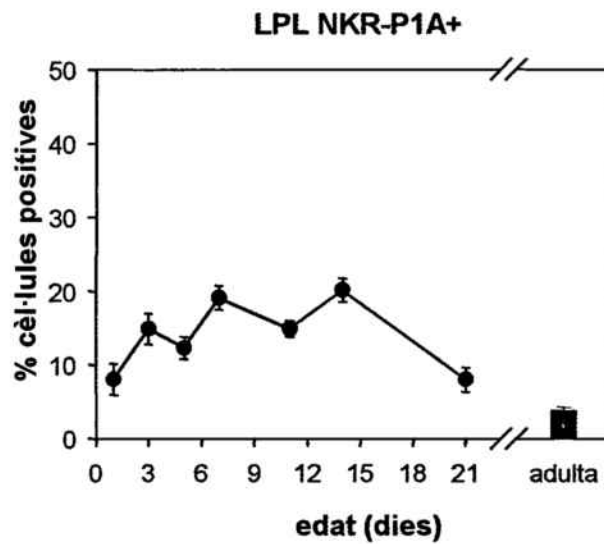


Figura 41

Evolució de LPL NKR-P1A+ durant el període de lactància i en animals adults. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm EEM de 4-8 valors, cadascun procedent d'un animal o de 2-4 animals agrupats en funció de l'edat.

L'estudi de l'expressió de la molècula CD8 en cèl·lules NK a la LP (Figura 42) posa de manifest, a excepció del dia 1, que durant les dues primeres setmanes de vida, el percentatge de LPL NKR-P1A+ que presenten la molècula CD8 és superior al 50%. Durant l'última setmana del període de lactància, coincidint amb la davallada de les cèl·lules NK, la proporció de CD8+ i CD8- en LPL NKR-P1A+ s'inverteix, de forma que la majoria de cèl·lules NK a la LP són CD8-, patró que es manté a l'edat adulta.

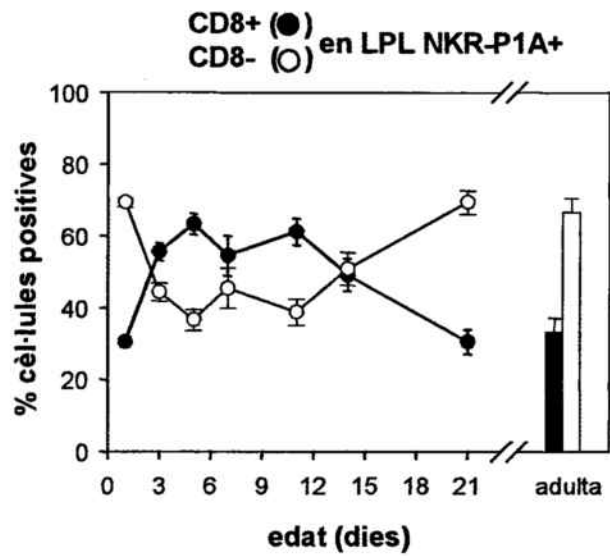


Figura 42

Evolució de les subpoblacions CD8+ i CD8- en cèl·lules NKR-P1A+ de LP durant el període de lactància i en animals adults. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm EEM de 4-8 valors, cadascun procedent d'un animal o de 2-4 animals agrupats en funció de l'edat.

4. CAPACITAT SECRETORA D'IMMUNOGLOBULINES A L'INTESTÍ PRIM DE RATA DURANT EL PERÍODE DE LACTÀNCIA

Les cèl·lules secretores d'Ig (*Ig-secreting cells*, SC) de la làmina pròpia de l'ili de rates lactants (Figura 43A) i adultes (Figura 43B) s'ha quantificat mitjançant la tècnica d'ELISPOT. Durant el període d'al·letament, la presència d'IgM-SC i IgA-SC depèn de l'edat ($p < 0,01$). Així, ambdós tipus de cèl·lules secretores són absents durant la primera setmana de vida, només unes poques cèl·lules adquireixen la capacitat secretora d'IgM durant la segona setmana i, al final del període de lactància, el nombre d'IgM-SC o IgA-SC incrementa dràsticament ($p < 0,01$ dia 21 respecte els dies 14 i 18), essent les d'IgM-SC més abundants que les IgA-SC ($p < 0,01$ el dia 18). Posteriorment al dia de deslletament, la relació entre ambdós tipus cel·lulars s'inverteix, és a dir, les IgA-SC passen a ser la població secretora espontània principal en la mucosa intestinal ($p < 0,01$, IgA-SC respecte IgM-SC). El nombre de cèl·lules secretores tant d'IgM com d'IgA és significativament superior a l'edat adulta en relació al nombre present en animals de 21 dies ($p < 0,05$).

Durant el període de lactància, no es detecten IgG-SC (resultat no mostrat). En canvi, a l'edat adulta en un 50% dels animals (3/6) es va demostrar la presència d'IgG-SC encara que a nivells propers al límit de detecció ($7,99 \pm 3,49$ IgG-SC / 10^6 cèl·lules, $n=3$).

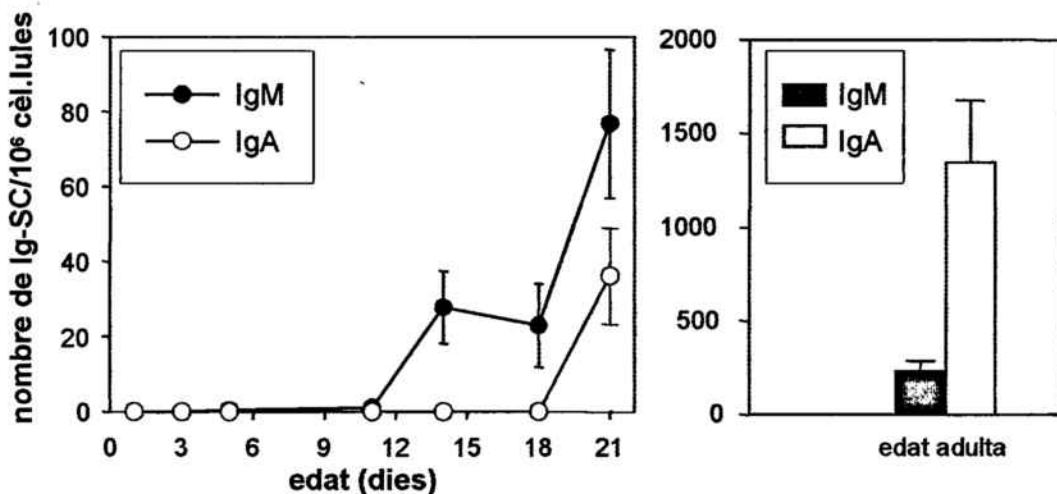


Figura 43

Evolució de cèl·lules secretores de IgM- i d'IgA- a la LP d'ili durant el període de lactància (A) i en animals adults (B). Els resultats estan expressat com a mitjana \pm EEM de 6 valors, cadascun derivat de duplicats de 4 dilucions seriadades de les suspensions cel·lulars.

5. DESENVOLUPAMENT DE LIMFÒCITS INTRAEPITELIALS EN RATOLINS MASCLES AMB TCR H-Y

5.1. APARICIÓ DE IEL CD8 $\alpha\alpha$ +, CD8 $\alpha\beta$ + I CD8- EN L'EPITELI INTESTINAL

S'han examinat els IEL de ratolins transgènics TCR H-Y homozigots i de tipus MHC F1 a partir dels 15 dies d'edat i de forma setmanal fins a les 6 setmanes (apartat 2.2. de Material i mètodes).

L'anàlisi dels IEL s'ha realitzat seleccionant la població de cèl·lules doblement positives CD3+ TCR H-Y+ i en aquesta s'ha estudiat l'expressió de les molècules CD8 α i CD8 β .

Els resultats d'aquesta anàlisi (Figura 44 i Taula 9) permeten observar que, en els ratolins MHC F1 de 2 setmanes d'edat, un 44% dels IEL no presenten cap de les dues formes de la molècula CD8, és a dir són CD8-, un 48% dels IEL són CD8 $\alpha\beta$ + i només un 6% són CD8 $\alpha\alpha$ +

Taula 9:

Evolució dels IEL CD8 $\alpha\alpha$ +, CD8 $\alpha\beta$ + i CD8- en ratolins transgènics mascles MHC F1

Mascles MHC F1		IEL CD3+ TCR H-Y+		
edat (setmanes)	n	CD8 $\alpha\alpha$ +	CD8 $\alpha\beta$ +	CD8-
		(% \pm DEM)	(% \pm DEM)	(% \pm DEM)
2	4	6 \pm 1	48 \pm 9	44 \pm 8
3	6	17 \pm 5	52 \pm 9	26 \pm 5
4	8	36 \pm 5	54 \pm 6	10 \pm 6
5	6	42 \pm 5	51 \pm 5	5 \pm 2
6	2	40 \pm 1	53 \pm 4	7 \pm 2

En els mateixos animals, entre les 3 i 4 setmanes d'edat, els IEL CD8- disminueixen des d'un 26% fins a un 10%, representant a les 4 setmanes de vida, només una petita fracció de la població CD3+. Pel contrari, els IEL CD8 $\alpha\beta$ + romanen al voltant d'un 53%, mentre que els CD8 $\alpha\alpha$ + incrementen des d'un 17% a un 36% en aquest període. A les 5 setmanes d'edat, una petita proporció de IEL són CD8-, mentre que la majoria expressen la molècula CD8 en qualsevol de les formes CD8 $\alpha\alpha$ i CD8 $\alpha\beta$ (Figura 44A). Globalment, entre les 2 i les 5 setmanes d'edat hi ha un augment de la proporció de IEL CD8 $\alpha\alpha$ + ($p < 0,05$) i una davallada de la de CD8- ($p < 0,05$), mentre que el percentatge de IEL CD8 $\alpha\beta$ + no varia significativament. D'altra banda, les proporcions dels IELs CD8 $\alpha\alpha$ +, CD8 $\alpha\beta$ + i CD8-

corresponents a les 5 setmanes d'edat són del mateix ordre que les determinades a les 6 setmanes (Taula 9).

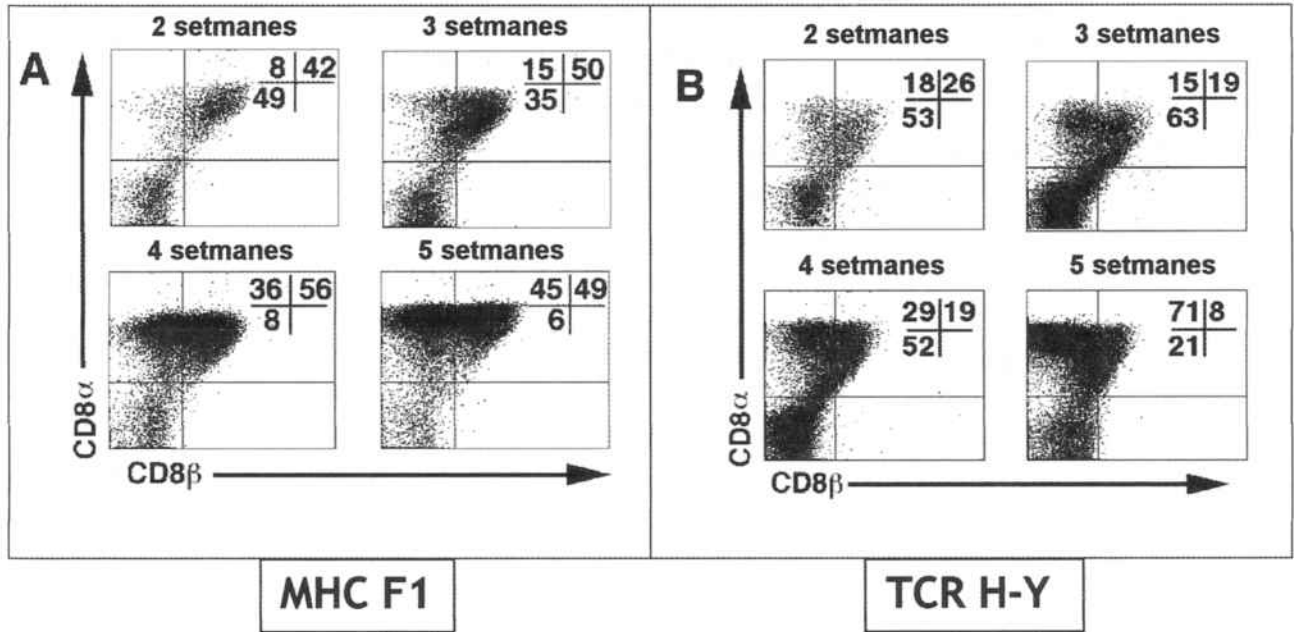


Figura 44

Evolució dels IEL CD8 $\alpha\alpha$ ⁺, CD8 $\alpha\beta$ ⁺ i CD8⁻ en ratolins transgènics MHC F1 (A) i MHC homozigots pel TCR H-Y (B). El percentatge de cèl·lules es mostra a la part superior dreta de cada quadrant. Es mostren resultats representatius de 2-8 experiments individuals descrits també en la Taula I.

Tot i que els IEL de ratolins adults homozigots TCR H-Y són majoritàriament CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ (Rocha i col., 1992; Poussier i col., 1993; Cruz i col., 1998), aquest no és el cas per als IEL durant les primeres etapes de vida (Taula 10). Així, més del 50% de IEL a les 2 setmanes de vida no expressen la molècula CD8, mentre que un 23% són CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ i un 18% són CD8 $\alpha\beta$ ⁺ (Figura 44B). La proporció de IEL CD8 $\alpha\beta$ ⁺ no presenta variacions significatives durant tot el període estudiat, mentre que la proporció de IEL CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ incrementa substancialment des d'un 33% a les 4 setmanes fins a un 61% una setmana més tard, fet que comporta una disminució paral·lela de la població CD8⁻ (Figura 44B). Les proporcions de IEL CD8⁻ i CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ presents a les dues setmanes de vida són estadísticament diferents ($p < 0,05$) a les quantificades en animals de 5 setmanes (Taula 10).

Taula 10

Evolució dels IEL CD8 $\alpha\alpha$ +, CD8 $\alpha\beta$ + i CD8- en ratolins transgènics mascles TCR H-Y

Mascles TCR H-Y		IEL CD3+ TCR H-Y+		
edat (setmanes)	n	CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ (% \pm DEM)	%CD8 $\alpha\beta$ ⁺ (% \pm DEM)	%CD8 ⁻ (% \pm DEM)
2	5	23 \pm 6	18 \pm 4	58 \pm 5
3	2	21 \pm 4	11 \pm 3	68 \pm 2
4	3	33 \pm 6	16 \pm 3	50 \pm 4
5	4	61 \pm 7	17 \pm 3	22 \pm 4

Les diferències en els percentatges de IEL CD8⁺ i CD8⁻ entre 2 i 5 setmanes d'edat en ambdós tipus de ratolins, MHC F1 i TCR H-Y, s'acompanyen de variacions en el nombre total d'aquestes poblacions de IEL, tal i com es mostra a la Figura 2 per als ratolins MHC F1. Així, en aquests animals, el nombre de IEL CD8 $\alpha\alpha$ ++ incrementa més de 100 vegades entre les 2 i les 4 setmanes d'edat (Figura 45).

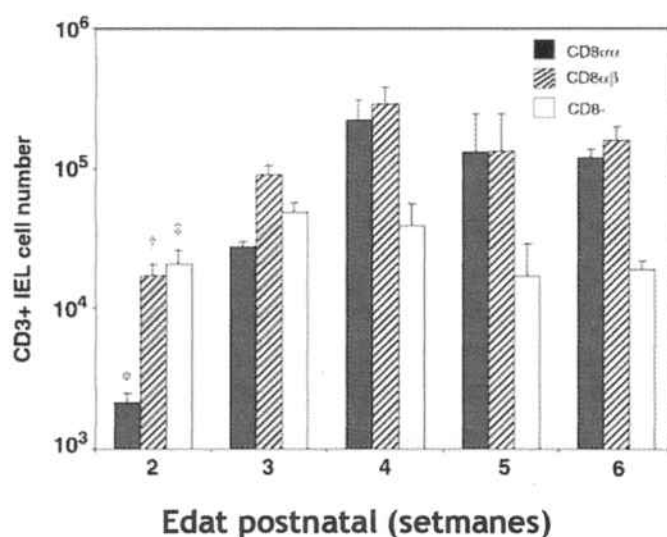


Figura 45

Evolució del nombre de IEL CD8⁺ i CD8⁻ en ratolins MHC F1. Els resultats s'expressen en forma de mitjana + DEM derivat de 2-8 experiments. *p<0,05 en comparar 2 setmanes d'edat respecte a 3-6 setmanes. †p<0,05 en comparar 2 setmanes d'edat respecte 4-6 setmanes

Pel que fa als IEL CD8⁻, el nombre absolut d'aquesta subpoblació limfocítica es manté durant el període comprès entre les 2 i les 6 setmanes d'edat, mentre augmenta el nombre de IEL CD8⁺ (Figura 2). Aquests resultats, indiquen un acúmulo de cèl·lules T, ja sigui a

causa de migració, expansió o diferenciació originada durant les primeres etapes de desenvolupament.

5.2. APARICIÓ DE LIMFÒCITS CD8 $\alpha\alpha$ +, CD8 $\alpha\beta$ + I CD8- EN TIMUS I MELSA

Els canvis observats en les poblacions de IEL CD8+ i CD8- (apartat 4.3.1. de Resultats) van portar a l'estudi d'aquestes subpoblacions en timus i melsa en els mateixos animals.

En melsa d'animals MHC F1, la proporció de limfòcits CD8 $\alpha\beta$ + es manté per sobre del 75% des de les dues setmanes d'edat i durant tot el període estudiat i és similar a la descrita per animals adults MHC F1 (Podd i col., 2001) (Figura 46A).

En animals mascles TCR H-Y, al voltant d'un 90% dels limfòcits T esplènics són CD8- encara que hi ha un 8-9% de limfòcits CD8 $\alpha\beta$ + fins a les 4 setmanes d'edat. A les 5 setmanes, la proporció de limfòcits CD8 $\alpha\beta$ + disminueix fins al 2% (Figura 46B).

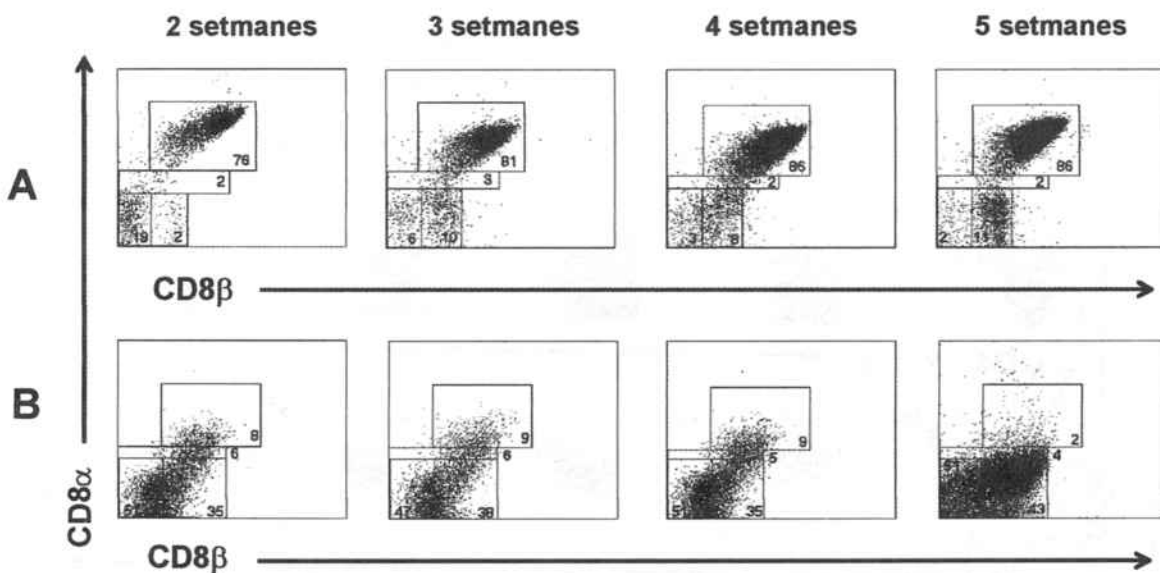


Figura 46

Evolució de cèl·lules esplèniques de ratolins transgènics MHC F1 (A) i TCR H-Y (B) durant les primeres setmanes després del naixement. Els citogrames mostren el patró CD8 α /CD8 β de la població limfocítica CD3+ TCR H-Y+. El percentatge de cèl·lules es mostra en la part superior dreta de cada quadrat. Les figures mostren resultats representatius d'un mínim de 3 experiments.

La presència de limfòcits T $CD8\alpha\beta^+$ en el compartiment intraepitelial (Figures 44A i 44B) i a la melsa (Figures 3A i 3B) suggereix que el llinatge $CD8\alpha\beta$ és seleccionat de forma positiva durant el període postnatal en els ratolins MHC F1 i també en els ratolins TCR H-Y, com a mínim inicialment (fins a les 4 setmanes de vida). Per tal de demostrar aquesta selecció positiva, s'ha estudiat el fenotip limfocític en timus.

Les cèl·lules del timus $CD8^+$ i DP en els ratolins mascles MHC F1 presenten el fenotip $CD8\alpha\beta^+$ durant tot el període estudiat. A la Figura 47A es mostra un citograma representatiu corresponent a les 3 setmanes d'edat.

Sorprenentment, en ratolins mascles TCR H-Y l'anàlisi de les poblacions $CD8^+$ i DP posa de manifest que, a més de la subpoblació $CD8\alpha\beta^+$, hi ha una elevada proporció de cèl·lules $CD8\alpha\alpha^+$ (Figura 47B). Entre les 2 i les 4 setmanes, la proporció de timòcits $CD8\alpha\alpha^+$ oscil·la entre 55 i 63% i posteriorment aquest percentatge davalla, sent del 23% a les 5 setmanes de vida. De forma paral·lela s'observa una disminució de cèl·lules $CD8^+$ i DP en el timus dels animals TCR H-Y (Figura 47B).

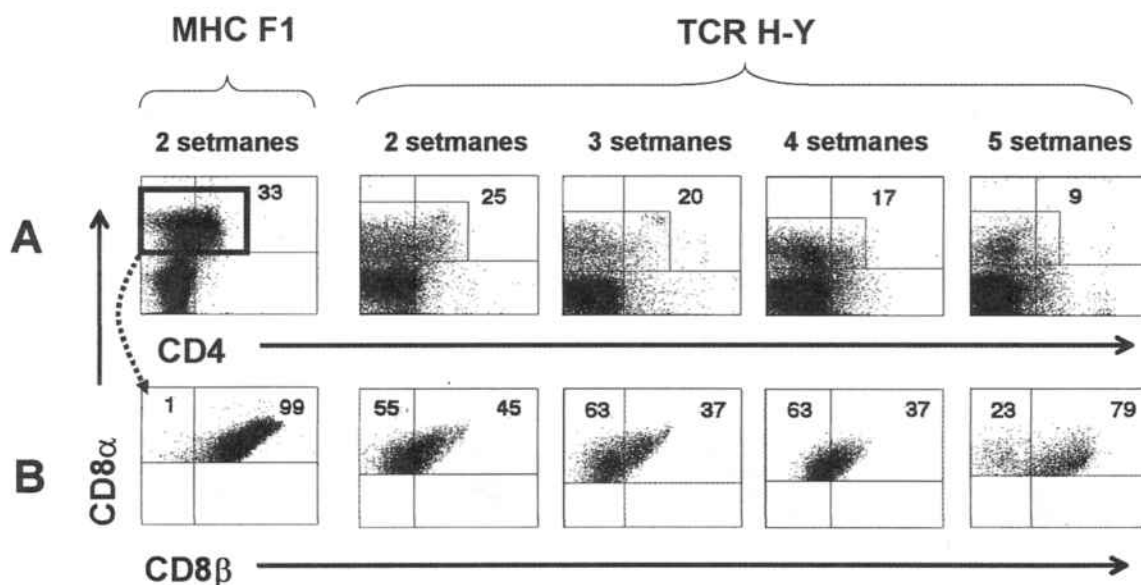


Figura 47.

Evolució de les cèl·lules de timus de ratolins mascles transgènics MHC F1 (A) i TCR H-Y (B) durant les primeres setmanes després del naixement. Els citogrames mostren el patró $CD8/CD4$ (citogrames superiors) i $CD8\alpha/CD8\beta$ de la població $CD8^+$ i DP (imatges inferiors) en la població limfocítica $CD3^+$ TCR H-Y⁺. El percentatge de cèl·lules es mostra en la part superior dreta de cada quadrant. Les figures mostren resultats representatius d'un mínim de 3 experiments.

Per tant, el timus dels ratolins mascles MHC F1 retenen l'estat DP i CD8 $\alpha\beta$ + mentre que aquestes poblacions disminueixen gradualment en animals mascles TCR H-Y, demostrant el procés de selecció negativa i deleció del llinatge CD8+ (Figura 47).

La relació entre l'evolució que experimenten les cèl·lules progenitores dels ratolins TCR H-Y en el timus (Figura 47B) i els limfòcits CD8 $\alpha\beta$ + en els dos compartiments perifèrics estudiats (Figura 44B i 46B), confirma que el procés de selecció negativa i deleció en el timus es troba reduït durant les primeres etapes de vida.

5.3. EFECTE DEL TRACTAMENT AMB EL PÈPTID AGONISTA DEL TCR H-Y SOBRE L'EXPANSIÓ DE IEL CD8 $\alpha\alpha$ +

L'expansió de IEL CD8 $\alpha\alpha$ + succeeix de forma tardana en el desenvolupament postnatal en els dos models estudiats (apartat 3.1. de Resultats) (Figura 43). Aquesta baixa proporció de IEL CD8 $\alpha\alpha$ + en les primeres etapes de vida podria ser deguda a un defecte intrínsec en els propis limfòcits IEL CD8 $\alpha\alpha$ + que afectaria la capacitat d'expandir-se en resposta a la presència de senyals agonistes. Alternativament, també podria ser degut a un defecte en la capacitat tímica per dirigir el desenvolupament i expansió d'aquestes cèl·lules.

Per tal d'esbrinar quina és la possible causa, es van tractar ratolins TCR H-Y i MHC F1 amb el pèptid agonista o amb AcMo anti-CD3 de forma prèvia a l'aïllament i anàlisi dels IEL. Aquest estudi es va realitzar durant les primeres 2-5 setmanes de vida (apartat 2.2. de Material i mètodes). Els resultats obtinguts es mostren a la Figura 48.

L'administració de pèptid agonista a ratolins MHC F1 a les 2 i 3 setmanes d'edat provoca un increment significatiu en el nombre de IEL CD8 $\alpha\alpha$ + ($p < 0,05$) quan es comparen amb animals no tractats (Figura 43) ($p < 0,05$), de forma que a les 2 setmanes aquesta proporció és duplica. De forma paral·lela, la proporció de IEL CD8- disminueix dràsticament durant el mateix període en els animals tractats. En aquest mateix període, el percentatge de IEL CD8 $\alpha\beta$ + també incrementa per l'administració del pèptid, però no de forma tan marcada (Figura 48).

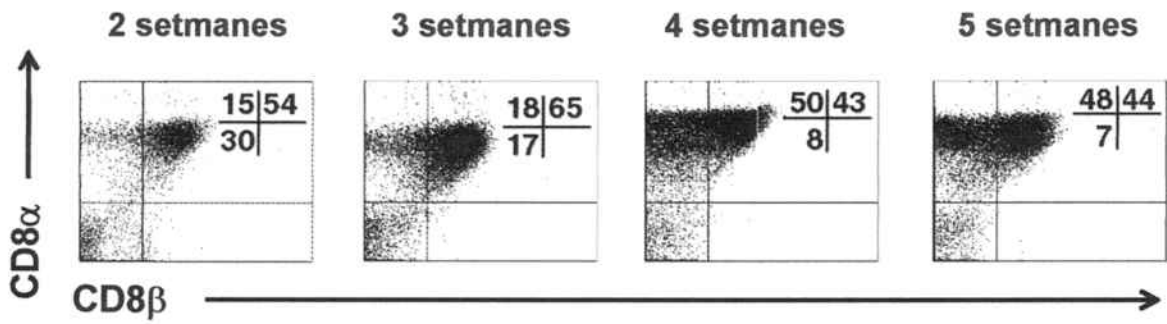


Figura 48

Efecte del pèptid agonista Smcy-3 sobre el desenvolupament de IEL en ratolins transgènics MHC F1. Els citogrames mostren el patró CD8 α /CD8 β de la població limfocítica CD3⁺ TCR H-Y⁺. El percentatge de cèl·lules es mostra en la part superior dreta de cada quadrant. Les figures mostren resultats representatius d'un mínim de 3 experiments.

Per tant, tot i que els IEL CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ no arriben mai a ser la població majoritària en els ratolins MHC F1, el tractament amb el pèptid agonista, comporta una acceleració en el procés d'aparició d'aquest tipus cel·lular mentre que la proporció de IEL CD8 $\alpha\beta$ ⁺ no presenta grans variacions (Figura 48).

Un efecte sobre les proporcions de IEL CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ i CD8⁻ s'observa en ratolins TCR H-Y de 4 setmanes d'edat tractats amb el pèptid agonista o amb un altre agonista del TCR com és l'AcMo anti-CD3 (Figura 49). Cal destacar que el tractament de ratolins MHC F1 no va modificar la distribució dels limfòcits T a la melsa, on les cèl·lules CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ representen una proporció mínima (<2%).

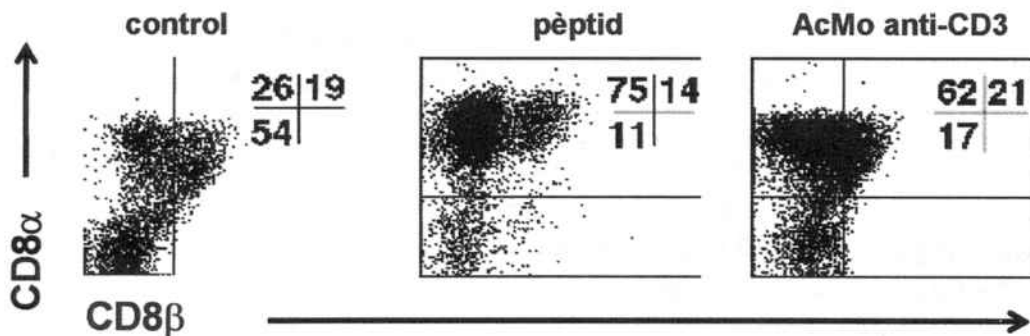


Figura 49

Efecte de l'estimulació limfocítica sobre el desenvolupament de IEL en ratolins transgènics TCR H-Y mascles de 4 setmanes. Els citogrames mostren el patró CD8 α /CD8 β en la població limfocítica CD3⁺ TCR H-Y⁺. El primer citograma correspon a animals no tractats, el segon als tractats amb pèptid agonista i el tercer amb l'AcMo anti-CD3. El percentatge de cèl·lules es detalla en la part superior dreta de cada quadrant. Les figures són representatives d'un mínim de 3 experiments.

5.4. ESTUDI IN VITRO DELS POSSIBLES PRECURSORS DELS LIMFÒCITS T CD8 $\alpha\alpha$ +

La cinètica d'aparició de IEL CD8 $^-$ i CD8 $\alpha\beta$ $^+$ de forma prèvia a la de IEL CD8 $\alpha\alpha$ $^+$ i la disminució paral·lela de IEL CD8 $^-$ abans de l'expansió dels CD8 $\alpha\alpha$ $^+$ (apartat 3.1. de Resultats) suggereix que els IEL CD8 $\alpha\alpha$ $^+$ poden derivar de cèl·lules T CD8 $^-$ o bé CD8 $\alpha\beta$ $^+$ de l'intestí.

Per tal d'esbrinar l'origen dels IEL CD8 $\alpha\alpha$ $^+$, les subpoblacions de limfòcits CD8 $^-$, CD8 $\alpha\beta$ $^+$ i CD8 $\alpha\alpha$ $^+$ aïllats de melsa i del compartiment intraepitelial s'han cultivat, per separat, en presència d'AcMo anti-CD3 o de APC procedents de mascles Rag2 $^{-/-}$ -que presenten el pèptid agonista (APC Ag $^+$)- i s'han analitzat els possibles canvis produïts en l'expressió de la molècula CD8 (Figures 50, 51 i 52).

Els IEL CD8 $^-$ són capaços d'originar una important població de cèl·lules T CD8 $\alpha\alpha$ $^+$ quan s'estimulen tant de forma inespecífica (AcMo anti-CD3), com per les APC Ag $^+$. Com es mostra a la Figura 50, el cultiu de la població de IEL CD8 $^-$ genera un 50% o un 32% de limfòcits CD8 $\alpha\alpha$ $^+$ en resposta a l'AcMo anti-CD3 o APC Ag $^+$, respectivament. Ambdós estímuls comporten l'aparició d'una baixa proporció de limfòcits CD8 $\alpha\beta$ $^+$ (2-5%).

Contràriament, les cèl·lules T CD8 $^-$ aïllades de la melsa i incubades en presència d'AcMo anti-CD3 o APC de ratolí mascle, no són capaces de desenvolupar aquesta població (Figura 50) i per tant mostra que el desenvolupament de cèl·lules CD8 $\alpha\alpha$ a partir de precursors T CD8 $^-$ es troba restringit al compartiment intraepitelial.

La presència de cèl·lules T CD8 $\alpha\beta$ $^+$ en la melsa i en IEL en les primeres etapes de vida en els ratolins TCR H-Y i MHC F1 suggereix que les cèl·lules CD8 $\alpha\beta$ $^+$ poden ser precursors dels IEL CD8 $\alpha\alpha$ $^+$. Quan les cèl·lules CD8 $\alpha\beta$ $^+$ de melsa o IEL de ratolins MHC F1 són estimulades amb anti-CD3, la majoria mantenen la molècula CD8 heterodimèrica (Figura 51), mentre que l'estimulació amb APC Ag $^+$ indueix la seva conversió a cèl·lules CD8 $^-$. Per tant, les cèl·lules CD8 $\alpha\beta$ $^+$ no esdevenen CD8 $\alpha\alpha$ $^+$.

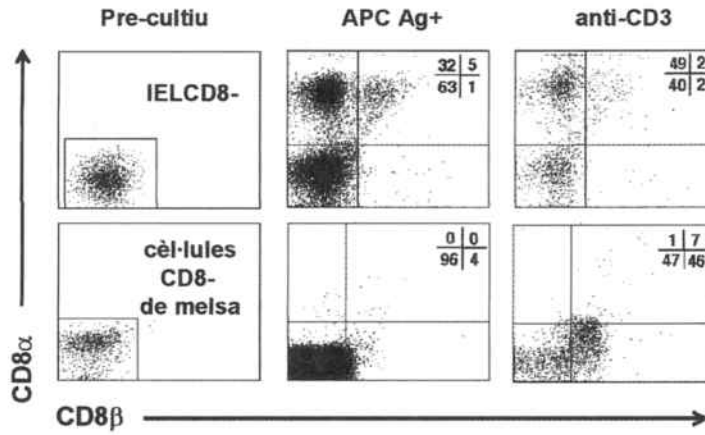


Figura 50

Estudi fenotípic de cèl·lules derivades de l'activació de limfòcits T CD8-. Es mostra el patró CD8 α /CD8 β expressat en resposta a l'estimulació amb AcMo anti-CD3 i APC Ag+ de la població de IEL CD8- procedent de ratolins mascles TCR H-Y (diagrames superiors) i de cèl·lules esplèniques T CD8- derivades de ratolins mascles MHC F1 (diagrames inferiors). Els resultats són representatius d'un mínim de tres experiments per cada població mostrada.

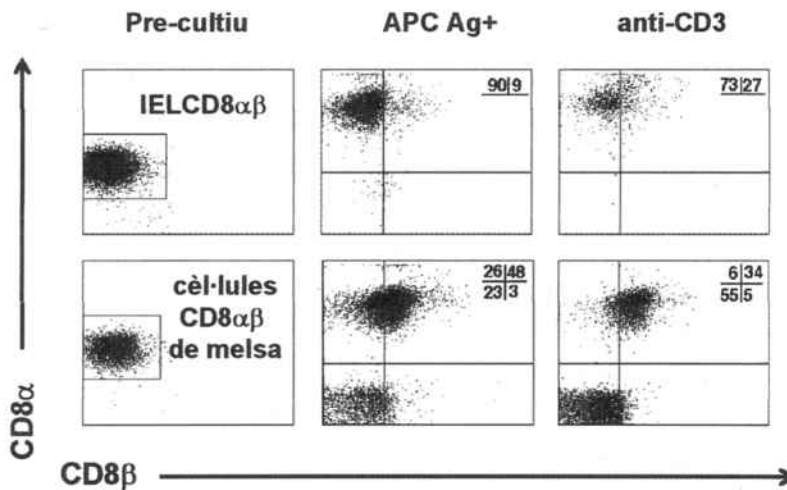


Figura 51

Estudi fenotípic de cèl·lules derivades de l'activació de limfòcits T CD8 $\alpha\beta$ +. Es mostra el patró CD8 α /CD8 β expressat en resposta a l'estimulació amb AcMo anti-CD3 i APC Ag+ de la població de IEL CD8 $\alpha\beta$ + (diagrames superiors) i de cèl·lules esplèniques T CD8 $\alpha\beta$ + (diagrames inferiors) derivades de ratolins mascles MHC F1. Els resultats són representatius d'un mínim de tres experiments per cada població mostrada.

Per últim, els IEL $CD8\alpha\alpha$ procedents de ratolins TCR H-Y incubats amb AcMo anti-CD3 o APC Ag+ experimenten un increment dels nivells d'expressió de la molècula $CD8\alpha\alpha$ però no originen poblacions $CD8\alpha\beta+$ o $CD8-$ (Figura 52).

Aquests resultats indiquen que els IEL $CD8-$ són els precursors més eficients de $CD8\alpha\alpha+$ i que la presència del senyal agonista a través del TCR és suficient per dirigir aquesta diferenciació. A més a més, suggereixen que els IEL $CD8-$ són diferents de les cèl·lules $CD8-$ de la melsa i per tant poden tenir una capacitat intrínseca per diferenciar-se en cèl·lules $CD8\alpha\alpha+$ en resposta a senyals agonistes a través del TCR.

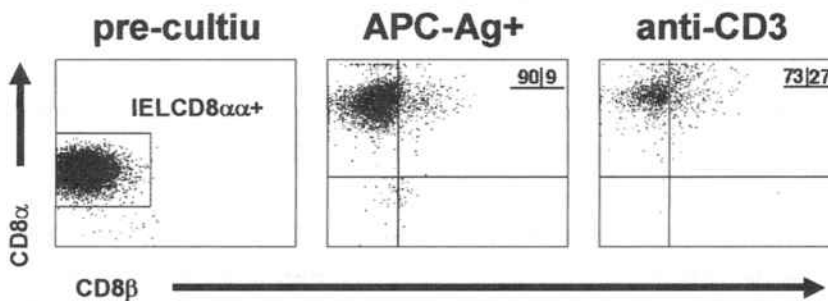


Figura 52

Estudi fenotípic de cèl·lules derivades de l'activació de limfòcits T $CD8\alpha\alpha+$. Es mostra el patró $CD8\alpha/CD8\beta$ expressat en resposta a l'estimulació amb AcMo anti-CD3 i APC Ag+ de la població de IEL $CD8\alpha\alpha+$ derivat de ratolins mascles TCR H-Y. Els resultats són representatius d'un mínim de tres experiments per cada població mostrada.

5.4. SELECCIÓ ANTIGÈNICA D'UNA ÚNICA POBLACIÓ DE CÈL·LULES CD8+ EN L'INTESTÍ PRIM

5.5.1. CREACIÓ D'UNA NOVA LÍNIA DE RATOLINS TRANSGÈNICS TCR H-Y AMB EXPRESSIÓ DE Smcy A NIVELL INTESTINAL.

Per tal de determinar si l'expressió de l'antigen específic amb alta afinitat del TCR H-Y (Smcy) a l'epiteli intestinal és suficient pel desenvolupament dels IEL CD8 $\alpha\alpha$ +, s'ha generat una línia de ratolins doble transgènics: pel receptor TCR H-Y i pel cDNA que codifica per expressió del seu antigen específic (Smcy) a nivell intestinal. En aquesta línia de transgènics s'ha centrat l'estudi en les femelles que expressen únicament l'antigen de forma transgènica ja que els mascles el presenten de forma constitutiva.

La construcció creada (**Figura 9**) està sota el control d'una variant del promotor FABP, tal i com es descriu a l'apartat 8. de Material i mètodes, de forma que dirigeix l'expressió del transgen de forma específica a nivell intestinal. La **Figura 53** mostra un gel representatiu del procés de confirmació de la presència dels diferents transgens mitjançant la tècnica de PCR sobre mostres de DNA de la cua dels animals doble transgènics (Smcy TCR H-Y). Cada mostra és amplificada utilitzant encebadors específics dissenyats per l'amplificació del transgen Smcy, el TCR transgènic H-Y i un gen constitutiu (p53).

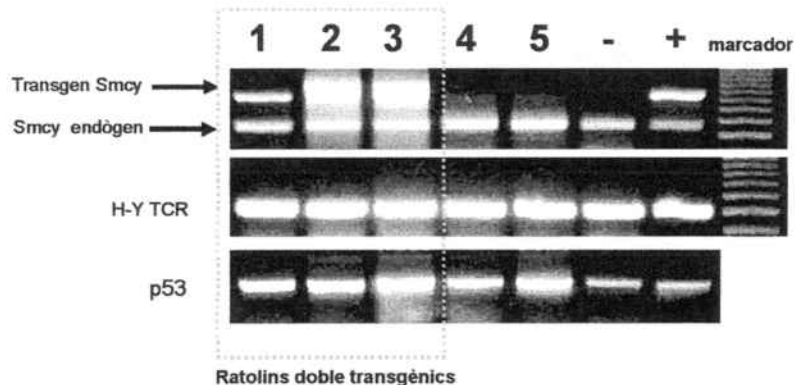


Figura 53

Gel representatiu on es mostren els productes d'amplificació dels gens analitzats en el procés de confirmació i selecció dels animals doble transgènics Smcy TCR H-Y. Els carrils 1, 2 i 3 són mostres procedents d'animals doble transgènics, i per aquesta raó presenten els productes d'amplificació corresponents a l'amplificació específica del transgen i de l'epítip. Els carrils 4 i 5 són mostres procedents de mascles no transgènics per a Smcy, però sí per al TCR H-Y. Per a cada mostra s'ha analitzat també la presència del gen constitutiu p53. Es confirma cada reacció de PCR mitjançant l'ús de controls positius i negatius. Per a la confirmació de la mida de les bandes s'ha utilitzat el marcador 123bp DNA Ladder, així com la d'una mostra de positivitat coneguda.

5.5.2. EXPRESSIÓ INTESTINAL DEL TRANSGEN Smcy

L'expressió del transgen Smcy a l'intestí prim dels ratolins s'ha confirmat mitjançant la detecció del seu mRNA específic en l'intestí proximal, medial i distal per tècniques de RT-PCR.

Tal i com es pot apreciar en la **Figura 54**, el mRNA pel Smcy va ser detectat al llarg de tot l'intestí prim dels animals transgènics per Smcy, mentre que no es va trobar expressió en altres teixits com la melsa dels mateixos animals, confirmant la fidelitat del promotor utilitzat.

Cal destacar però, que l'expressió del transgen només es pot confirmar en les femelles, ja que no es poden diferenciar els transcrits endògens dels transgènics en el cas dels mascles. A la **Figura 54** es mostra l'anàlisi d'expressió en dos controls no transgènics, un mascle i una femella.

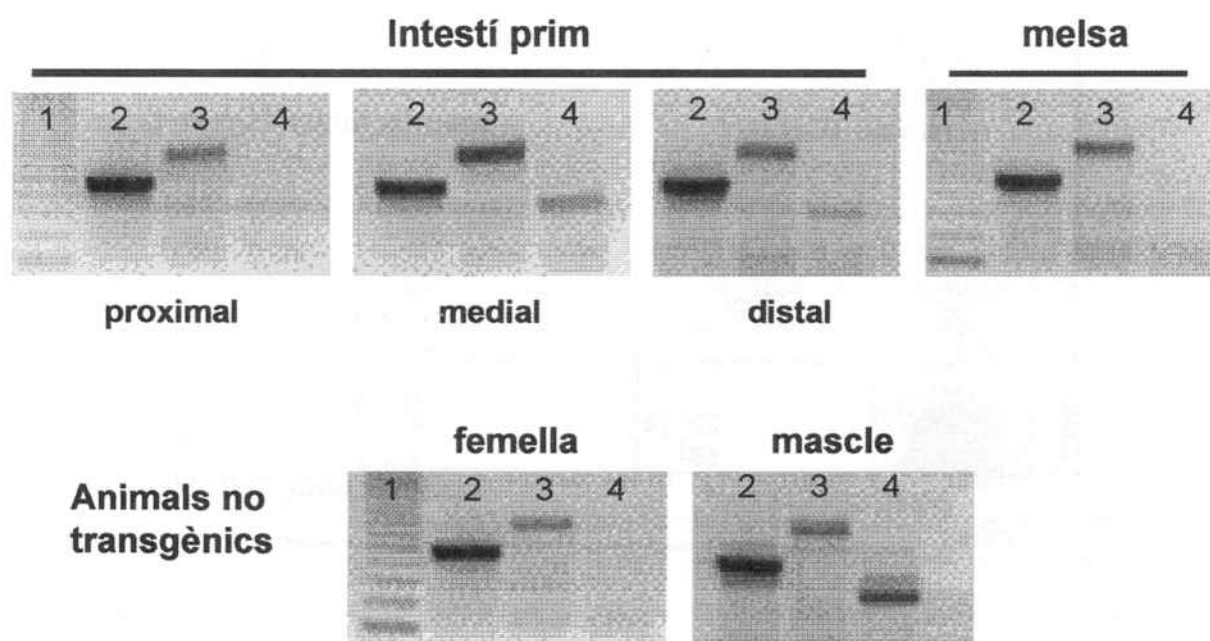


Figura 54

Expressió intestinal del transgen Smcy. La figura mostra gels representatius on es confirma l'expressió de Smcy (carril 4) en mostres de teixit intestinal proximal, medial i distal d'intestí prim. En el gel de la dreta superior es mostra l'absència d'expressió teixit esplènic. En el cas de les mostres procedents de mascles no transgènics es pot detectar la presència de mRNA per Smcy, que correspon al gen endogen. Per cada mostra s'ha analitzat també l'expressió de 2 gens constitutius: β -actina i SCF (carrils 2 i 3, respectivament). Per a la confirmació de la mida de les bandes s'ha utilitzat el marcador de 123bp DNA Ladder (carril 1).

5.5.3. DESENVOLUPAMENT DE IEL EN RATOLINS TRANSGÈNICS Smcy TCR H-Y

A la **Figura 55** es mostren citogrames representatius del patró CD8 α /CD8 β de IEL procedents de femelles doble transgèniques Smcy TCR H-Y, juntament amb els corresponents a mascles dobles transgènics i els procedents de mascle i femella TCR H-Y. Tal i com es pot apreciar, la majoria dels IEL de la femella Smcy TCR H-Y són CD8 $\alpha\alpha$ +, de forma similar al mascle TCR H-Y convencional, mentre que els IEL de la femella TCR H-Y són majoritàriament CD8-.

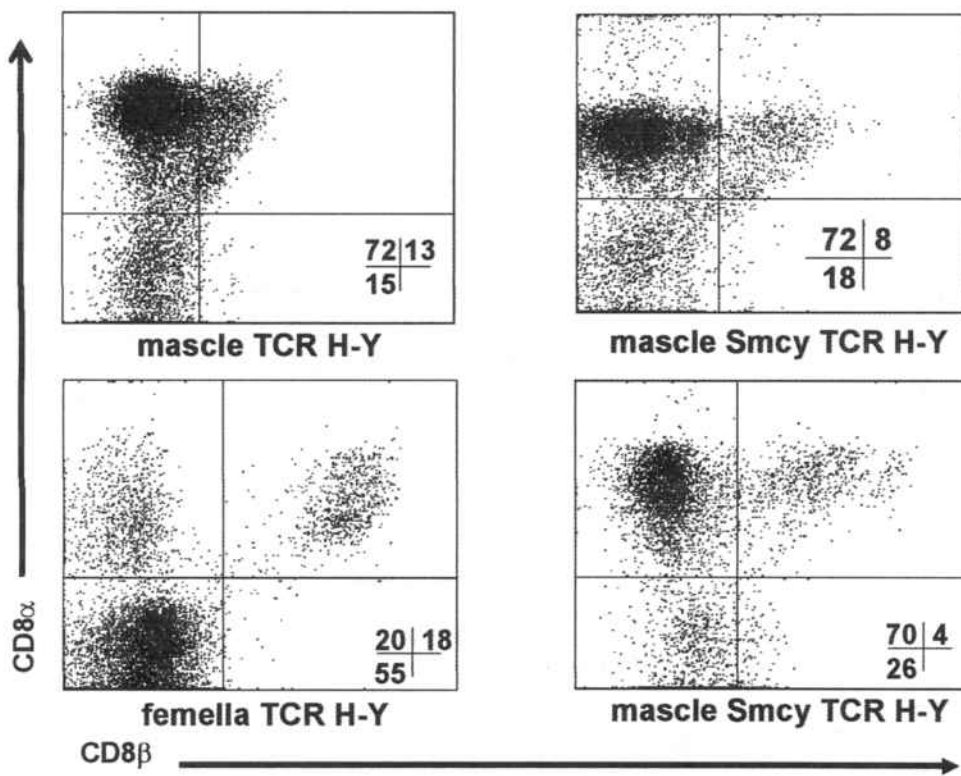


Figura 54

Citogrames representatius de IEL procedents d'animals Smcy TCR H-Y i de TCR H-Y convencionals, mascles i femelles. Els citogrames mostren el patró CD8 α /CD8 β en la població limfocítica CD3+ TCR H-Y+. El percentatge de cèl·lules es detalla en la part superior dreta de cada quadrant. Les figures són representatives de 5-15 animals.

La **Figura 56** resumeix els resultats globals dels animals estudiats. La població de IEL CD8 $\alpha\alpha$ + en femelles Smcy TCR H-Y (65 \pm 13%) és significativament superior a la corresponent

a aquest tipus cel·lular en la femella convencional TCR H-Y ($18\pm 8\%$) ($p < 0,05$). Pel contrari, la proporció de IEL $CD8\alpha\alpha+$ en la femella Smcy TCR H-Y no presenta diferències significatives respecte a la dels mascles transgènics convencionals TCR H-Y ($74\pm 11\%$). Aquest fet suggereix que expressió del senyal agonista en l'epiteli de l'intestí prim és suficient per la diferenciació i desenvolupament de IEL $CD8\alpha\alpha+$.

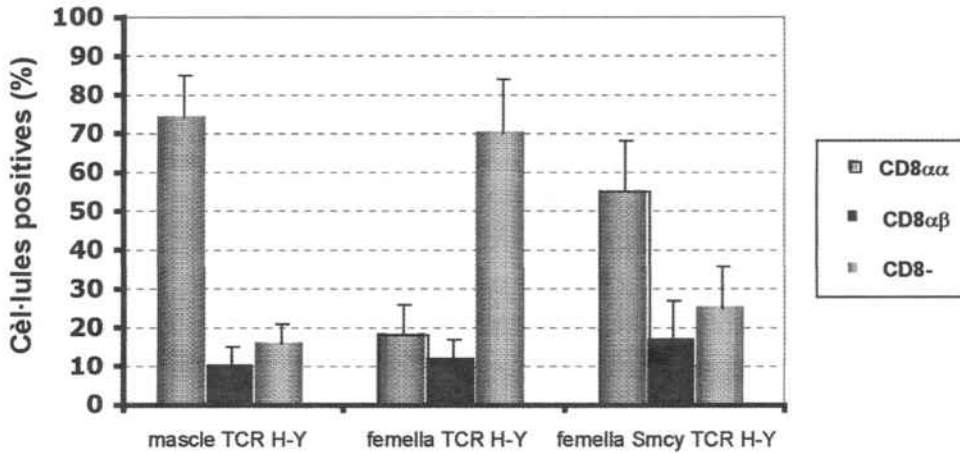


Figura 56

Diagrama que resumeix els resultats globals obtinguts de IEL procedents d'animals Smcy TCR H-Y i de TCR H-Y convencionals, mascles i femelles. Cada barra mostra la proporció de la població limfocítica corresponent: $CD8\alpha\alpha+$, $CD8\alpha\beta+$ i $CD8-$ en la població limfocítica $CD3+$ TCR H-Y+. Els resultats s'expressen com a mitjana + DEM procedent de l'anàlisi d'un nombre d'animals comprès entre 5-15. El percentatge de cèl·lules es detalla en la part superior dreta de cada quadrat.

D'altra banda, quan s'analitzen els canvis en el percentatge de la població $CD8-$ en els diferents tipus d'animals, s'observa un comportament invers al descrit pel subtipus $CD8\alpha\alpha+$ (Figures 55 i 56). En aquest sentit, la proporció de IEL $CD8-$ en la femella Smcy TCR H-Y ($25\pm 11\%$) és significativament menor a la de la femella TCR H-Y ($70\pm 14\%$) ($p < 0,05$) i no difereix a la dels mascles TCR H-Y convencionals ($16\pm 5\%$).

La proporció de IEL $CD8\alpha\beta+$ (15%) és similar en tots els animals. Aquestes dades suggereixen la conversió de cèl·lules $CD8-$ en cèl·lules $CD8\alpha\alpha+$ en l'ambient intestinal i en presència de l'antigen, de forma similar als resultats d'estimulació *in vitro* descrits en l'apartat 3. 4. de Resultats.

L'anàlisi dels diferents fenotips de IEL en els mascles Smcy TCR H-Y (Figura 55) posa de manifest que les proporcions de les diferents subpoblacions de IEL no s'afecten per

l'expressió del transgen *Smcy*, ja que no s'observen diferències significatives quan es comparen amb els mascles TCR H-Y convencionals.

5.5.4. ESTUDI DEL FENOTIP DE IEL CD8 $\alpha\alpha$ + GENERATS EN LA FEMELLA *Smcy* TCR H-Y

S'ha estudiat si el fenotip dels IEL CD8 $\alpha\alpha$ + de la femella doble transgènica *Smcy* TCR H-Y és similars al dels IEL CD8 $\alpha\alpha$ + de ratolins convencionals TCR H-Y. Per això, s'ha analitzat l'expressió de CD69 i $\alpha_E\beta_7$, marcadors de superfície cel·lular expressats amb elevada proporció i intensitat en IEL CD8 $\alpha\alpha$ + de ratolins no transgènics.

S'ha observat que pràcticament la totalitat dels IEL CD8 $\alpha\alpha$ + de la femella *Smcy* TCR H-Y és CD69+ i expressa la integrina específica de migració intestinal $\alpha_E\beta_7$, de forma similar als IEL del mascle TCR H-Y (Figura 57). Els pocs IEL CD8 $\alpha\alpha$ + de la femella TCR H-Y també presenten un fenotip similar, fet que suggereix que l'expressió d'aquestes molècules en els IEL no depèn de l'activació induïda per la presència del pèptid agonista.

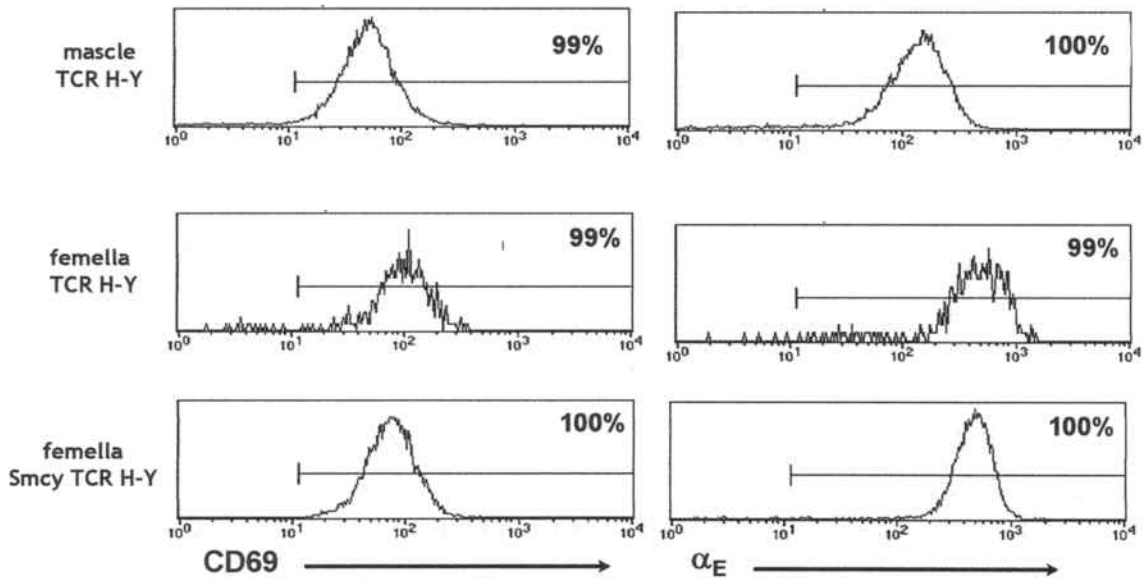


Figura 57

histogrames representatius de IEL CD8 $\alpha\alpha$ + procedents de femelles *Smcy* TCR H-Y i de TCR H-Y convencionals, mascles i femelles. Els histogrames mostren la intensitat d'expressió de les molècules CD69 i α_E en les cèl·lules CD8 $\alpha\alpha$ de la població limfocítica CD3+ TCR H-Y+. El percentatge de cèl·lules es detalla en la part superior dreta de cada quadrant. Les figures són representatives de 5-15 animals.

5.5.5. QUANTIFICACIÓ DE IEL EN LA FEMELLA Smcy TCR H-Y

Els IEL CD8 $\alpha\alpha$ + generats en les femelles Smcy TCR H-Y són similars en quant a fenotip i proporció als dels mascles TCR H-Y però quedava per veure el seu nombre absolut a l'epiteli intestinal.

Tal com es mostra a la **Figura 58**, el nombre total de IEL CD3+ en l'intestí prim de mascles TCR H-Y ($\sim 10^6$) és significativament superior al de les femelles Smcy TCR H-Y ($\sim 10^5$) i TCR H-Y ($\sim 10^4$) ($p < 0,05$ en ambdós casos). Encara que el nombre de IEL CD3+ en la femella Smcy TCR H-Y no assoleix el dels mascles TCR H-Y, és superior al nombre de IEL CD3+ de la femella TCR H-Y. Aquests resultats suggereixen que el desenvolupament normal dels IEL CD8 $\alpha\alpha$ + inclou una fase d'expansió que és incompleta en el model doble transgènic.

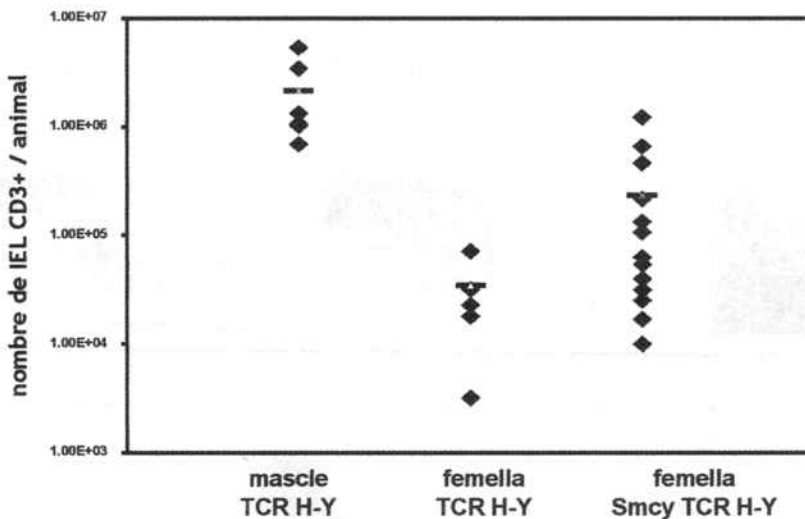


Figura 58

Diagrama que representa el nombre total de IEL CD3+ TCR H-Y+ procedents de femelles doble transgèniques Smcy TCR H-Y i de mascles i femelles TCR H-Y convencionals. La figura mostra els valors corresponents a un nombre d'animals de l'ordre són representatives de 5-15 animals.

5.5.6. LIMFÒCITS TÍMICS I ESPLÈNICS EN LA FEMELLA Smcy TCR H-Y

L'expressió dels coreceptors CD4 i CD8 en els timòcits és un indicador del procés de selecció que té lloc. Existirà absència de cèl·lules DP i gran nombre de DN quan hi ha selecció negativa a causa de la presència de l'antigen agonista, com és el cas dels ratolins mascles TCR H-Y. Existirà gran nombre de cèl·lules DP quan hi ha selecció positiva a causa de l'absència d'un antigen agonista, com és el cas dels ratolins femelles TCR H-Y.

L'estudi CD4/CD8 en el timus de les femelles doble transgèniques Smcy TCR H-Y indica la presència de cèl·lules DP, de forma similar a la femella H-Y convencional. És a dir, tot i la presència de gran nombre de IEL CD8 $\alpha\alpha$ + en la femella doble transgènica (Figura 55), existeix un procés normal de selecció positiva de les cèl·lules CD8 $\alpha\beta$ + en el timus (Figura 59).

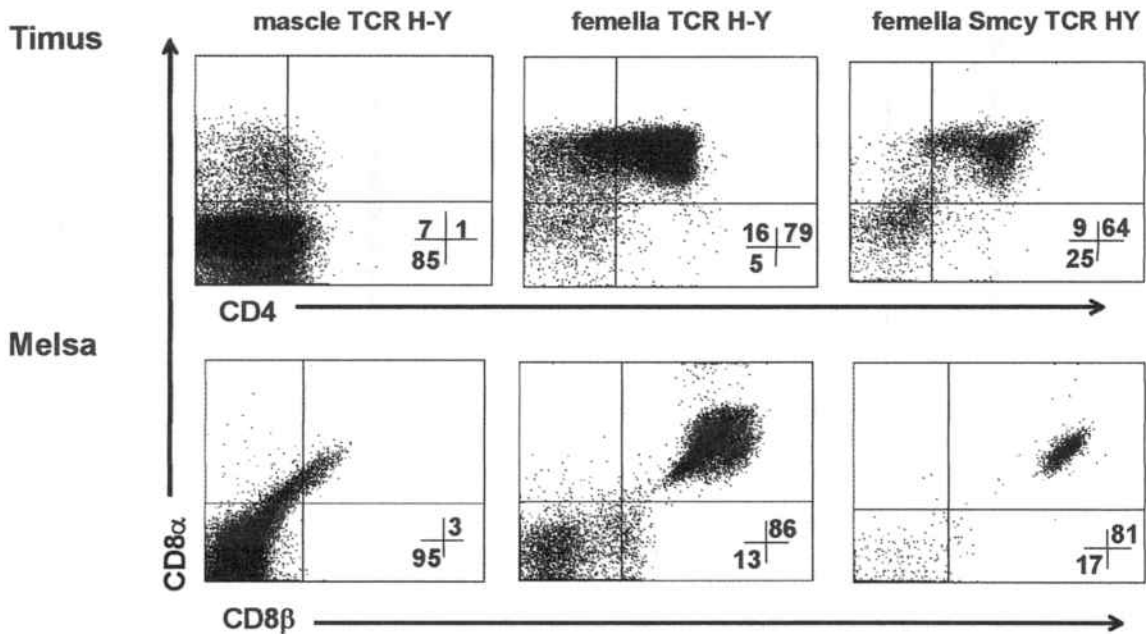


Figura 59

Citogrames biparamètrics de cèl·lules procedent de melsa i timus corresponents a femelles Smcy TCR H-Y i TCR H-Y convencionals, mascles i femelles. Els citogrames mostren el patró CD8 α /CD8 β en la població limfocítica CD3+ TCR H-Y+. El percentatge de cèl·lules es detalla en la part superior dreta de cada quadrant. Les figures són representatives de 5-15 animals.

De forma general, l'anàlisi de la població CD8 $\alpha\beta$ + en la perifèria reflecteix el procés de selecció tímica: els ratolins mascle TCR H-Y (selecció negativa) no presenten aquesta població a la perifèria, mentre que les femelles TCR H-Y (selecció positiva) presenten un gran nombre de CD8 $\alpha\beta$ + a la perifèria.

Tal com es mostra a la **Figura 59**, existeix una gran proporció de limfòcits $CD8\alpha\beta^+$ en la melsa de la femella doble transgènica Smcy TCR H-Y de forma similar a les femelles TCR H-Y. Contràriament, difereix del mascle TCR H-Y i tot i la presència de limfòcits $CD8\alpha\alpha^+$ a l'intestí en les femelles doble transgèniques.

Tots aquests resultats de forma conjunta suggereixen, que el desenvolupament dels IEL $CD8aa^+$ i la selecció positiva de cèl·lules $CD8ab^+$ en el timus no són fenòmens excloents. A més a més, el fet que el procés de selecció positiva persisteixi en la femella Smcy H-Y demostra que el model no presenta recirculació de APC Ag^+ procedents de l'intestí a nivell tímic.

DISCUSSIÓ

El desenvolupament del teixit limfoide associat a l'intestí (GALT) té lloc durant la vida fetal, però la seva activació s'inicia a partir del naixement (Brandtzaeg, 1998). Durant els primers dies de vida, el sistema immunitari intestinal és activat tant per la llet com per la incipient flora microbiana. Ambdós, proteïnes del aliments i microbiota, tenen un important paper fisiològic que permet la maduració del GALT (ter Steege i col., 1997; Brandtzaeg, 1998; Silva i col., 2003). Durant la lactància, aquests factors luminals inicien l'activació de les cèl·lules presents a l'intestí, però és en el moment de passar a una dieta sòlida i variada quan els nombre d'estímuls antigènics que rep l'intestí augmenta espectacularment i això comporta la maduració definitiva del GALT. En els rosegadors com la rata, el període de lactància dura unes tres setmanes, si bé després d'uns 14 dies els animals comencen, espontàniament, a compaginar la llet materna amb la dieta sòlida (Savage i col., 1977; Henning i col., 1981). En humans s'ha demostrat que, en el compartiment epitelial intestinal, els limfòcits ja estan presents durant la gestació, però l'estimulació per factors luminals provoca un clar increment en el seu nombre, el qual després del naixement i durant els 2 primers anys de vida incrementa de l'ordre de 10 vegades (Machado i col., 1994). D'altra banda, en el compartiment de la làmina pròpia, no s'ha descrit infiltració limfocítica en el moment del naixement, i aquesta només apareix després de l'exposició antigènica (Husband i col., 1996). Encara que antigens microbians i alimentaris són els factors exògens que més influeixen en el desenvolupament de les poblacions efectores del GALT de l'intestí prim, altres factors endògens com el nivell d'eficiència de presentació de l'antigen, la formació del complex MHC-Ag-TCR, o d'altres encara no gaire ben descrits, també estan implicats.

La primera part d'aquest estudi mostra els canvis fenotípics que experimenten els limfòcits intraepiteliais (IEL) i els limfòcits de làmina pròpia (LPL) procedents de l'intestí prim de rates Lewis des del dia de naixement i durant tot el període de lactància; fase durant la qual la rata canvia espontàniament la seva alimentació de la llet materna a la dieta sòlida (Henning i col., 1981). Els resultats s'han comparat amb els obtinguts a partir d'animals adults. Per a l'estudi de les poblacions de IEL, l'intestí s'ha dividit en dues meitats que s'han avaluat per separat, la meitat proximal (pSI), que comprèn el duodè i la major part del jejú, i la meitat distal (dSI), la qual inclou la resta de jejú i tot l'ili. L'estudi de LPL s'ha realitzat únicament en aquesta segona meitat ja que és la part d'intestí prim on es produeix més estimulació microbiana i per tant més activació del GALT (Savage, 1977).

En rates lactants es produeix, durant les 3 primeres setmanes de vida, un creixement ràpid de l'intestí prim, que es manifesta tant en el pes com en la seva longitud. En aquests animals, el pes de la meitat proximal és superior al del distal, mentre que en animals adults, ambdós fragments tenen un pes similar. La diferència observada en lactants, pot

esdevenir del fet que la llargada de les vellositats intestinals és superior en la meitat proximal que en la distal (Altmann i col., 1967) i que la capa epitelial, durant les primeres setmanes de vida té un pes important en relació a les altres capes intestinals. En aquesta primera etapa, la capa epitelial representa un 67% del volum total de l'intestí prim i a mesura que l'animal creix, la musculatura intestinal i el teixit connectiu incrementen, i per tant, el pes epitelial és relativament menor (Estrada i col., 1996).

Pel que fa al fenotip dels limfòcits presents al compartiment de la làmina pròpia (LP), s'ha pogut observar que, el dia del naixement, només un terç de les cèl·lules de la LP amb característiques FSS/SSC típiques de limfòcits presenten la molècula CD45 en la seva superfície, si bé la proporció incrementa ràpidament durant els primers dies de vida. De forma paral·lela, en el compartiment intraepitelial, la població de IEL colonitza l'intestí durant els primers dies de vida. Una gran proporció d'aquests IEL, de forma similar als LPL, no presenta la molècula CD45 a la seva superfície, encara que sí que expressen la molècula CD3. La molècula CD45 s'expressa ràpidament en gairebé tots els IEL, assolint valors d'adult el dia 14. La proporció de IEL que expressen CD3 també incrementa durant tot el període de lactància, de forma similar a estudis realitzats en ratolí (Kuo i col., 2001).

A més a més, el dia del naixement, la meitat dels IEL CD8⁺ expressen CD2, un marcador d'adhesió i activació que s'expressa en la majoria de limfòcits perifèrics però no en IEL de rata adulta (Fangmann i col., 1991), fet que evidencia la colonització intestinal per limfòcits d'altres teixits limfoides.

Una població limfocítica que sembla tenir un paper important durant les primeres etapes de vida, tant a la LP com a l'epiteli intestinal, són les cèl·lules NK, les quals són abundants en ambdós compartiments del GALT en rates neonates. De fet, en el cas de l'epiteli intestinal, el dia de deslletament, el percentatge de cèl·lules NK és encara superior que al de rata adulta. Aquests resultats concorden amb els descrits per Tice (1990), el qual defineix una activitat NK més gran en IEL de rates neonates i rates de 21 dies que en animals adults, i amb els resultats de Todd i col. (2001), els quals descriuen la presència d'un 50% de cèl·lules NKR-P1A⁺ en el compartiment intraepitelial en rates de 3 setmanes d'edat i només un 20% en animals adults.

Els nostres resultats indiquen la presència de dos tipus de cèl·lules NK en el compartiment intraepitelial: les NK CD8⁺ i les NK CD8⁻. Durant les dues primeres setmanes de vida, la majoria de NK presenten la molècula CD8, mentre que les cèl·lules NK CD8⁻ incrementen a partir del dia 5. A més a més, durant les dues primeres setmanes de vida, les cèl·lules NKR-P1A⁺CD8⁺ constitueixen una gran proporció dels IEL CD8⁺. Per tant, els limfòcits NKR-P1A⁺CD8⁺ a l'intestí prim poden ser essencials durant els primers dies de vida. Els IEL NKR-P1A⁺CD8⁺ perden la seva prevalença amb l'edat, i la principal població NK en rates adultes no expressa la molècula CD8 i representa només una baixa proporció de la població de IEL. Probablement, els NKR-P1A⁺CD8⁻ tampoc expressen la molècula CD3, segons es pot deduir

dels percentatges totals de IEL CD3 en l'edat adulta, ja que aquesta proporció no arriba al 100% i, a partir del dia 14, el percentatge complementari corresponent als IEL CD3 coincideix amb la proporció del IEL NKR-P1A+CD8-. Els nostres resultats i aquesta hipòtesi està d'acord amb estudis realitzats en intestí de rata adulta (Helgeland i col., 1997; Todd i col., 1999) on es mostren també fenotips cel·lulars de NK no trobats en altres teixits limfoides, com melsa o sang perifèrica (Torres-Nagel i col., 1992; Brissette-Storkus i col., 1994; Todd i col., 2001).

D'altra banda, hi ha poca informació sobre la presència de cèl·lules NK a la LP. En la LP intestinal humana, s'ha descrit absència o presència d'un baix nombre de cèl·lules NK (Abuzakouk i col., 1998, Kelsall, 1998). El present estudi demostra la presència d'aquest tipus cel·lular durant tot el període de lactància, de la mateixa forma que en ratolí (Tagliabue i col., 1982), en proporcions molt superiors a les de l'edat adulta. Tot i que, a diferència dels IEL, no hi ha canvis significatius en la proporció de cèl·lules NK durant la lactància, el fenotip d'aquestes varia després de la segona setmana de vida de forma paral·lela a la descrita pel compartiment epitelial: les cèl·lules NK CD8+ predominen durant el primer període, invertint-se al voltant del dia 14, on les cèl·lules NK CD8- passen a ser majoritàries.

El significat fisiològic dels canvis en les poblacions de NK roman incert. Es pot postular que les cèl·lules NKR-P1A+CD8+, juntament amb les cèl·lules TCR $\gamma\delta$ +CD8+, que també expressen gens presents en cèl·lules NK (Pennington i col., 2003), constitueixen la primera defensa en la mucosa intestinal de rates neonates, mentre els mecanismes d'immunitat adquirida no es troben totalment desenvolupats. A més a més, el canvi de fenotip de les cèl·lules NK CD8+ cap a CD8- podria representar una diferència a nivell funcional associada al seu estat maduratiu.

En el GALT difós existeixen una gran varietat de subpoblacions limfocítiques T CD8+ i T CD4+, DP així com DN, fenotips que són inusuals i que determinen unes poblacions altament especialitzades, activades i amb un estat maduratiu o de memòria molt específic (Zeitz i col., 1991; Hayday i col., 2001).

S'ha descrit que la làmina pròpia intestinal d'humans i rates adultes presenta majoritàriament limfòcits T CD4+ (Shanahan, 1994; Bruder i col., 1999; James, 1999), el que està d'acord amb els nostres resultats que demostren que un 58% dels LPL de rates adultes són CD4+. En canvi, durant el període de desenvolupament neonatal, la relació CD4/CD8 és diferent i la proporció de LPL CD8+ és 2-4 superior a la dels LPL CD4+. En aquest període, el llinatge de cèl·lules B no està ben desenvolupat i per tant no hi ha secreció d'Ig. Per tant, podria ser que, en aquest període, els limfòcits T CD8+ fossin els encarregats de controlar els antígens patògens procedents de la microbiota i els aliments. Els LPL CD8+ expressen CD3, i el TCR $\alpha\beta$ s'expressa gradualment durant els primers 11 dies

de vida; el dia del deslletament, al voltant d'un 65% dels LPL CD8+ són TCR $\alpha\beta$ + mentre que en l'edat adulta aquest percentatge és del 86%.

La població de IEL CD8+ és majoritària a l'epiteli intestinal a partir del dia 3 postnatal. Aquests limfòcits es poden subdividir en 3 subtipus cel·lulars mútuament excloents: els limfòcits TCR $\alpha\beta$ +, els TCR $\gamma\delta$ + i els NKR-P1A+. En el present treball es demostra que aquestes tres poblacions de limfòcits CD8+ ja estan presents el dia del naixement, i que les seves proporcions varien al llarg del període de lactància fins a l'edat adulta, seguint uns patrons de desenvolupament diferents i característics en funció de l'edat. En particular, s'ha observat una gran proporció relativa de IEL TCR $\gamma\delta$ + i NKR-P1A+ el dia de naixement i, posteriorment, la proporció de IEL TCR $\alpha\beta$ +CD8+ incrementa amb l'edat a expenses dels limfòcits NKR-P1A+. Des del dia de naixement fins a l'edat adulta, la proporció de IEL CD8+ que expressen el TCR $\alpha\beta$ incrementa progressivament, convertint-se en la població predominant abans del final de la primera setmana de vida. Tot i que aquests resultats no coincideixen en el dia d'aparició dels IEL TCR $\alpha\beta$ +CD8+ amb els resultats descrits per Helgeland i col. (1997), confirmen els seus resultats en referència a l'increment dependent de l'edat d'aquesta població durant el període perinatal. Així, els nostres resultats estan d'acord amb aquells que indiquen que la major part de IEL TCR $\alpha\beta$ + es pot desenvolupar i de forma precoç, independentment de la microflora luminal convencional que s'estableix després del deslletament (Helgeland i col., 1997). En ratolins també s'ha descrit un increment de IEL TCR $\alpha\beta$ + dependent de l'edat (Ter Steege i col., 1997), tot i que altres autors observen una disminució durant les tres primeres setmanes de vida (Kuo i col., 2001).

Les cèl·lules TCR $\gamma\delta$ apareixen de forma més primerenca que les cèl·lules TCR $\alpha\beta$ en la filogènia i en l'ontogènia, essent considerades com la població més primitiva (Bucy i col., 1988). La presència de IEL TCR $\gamma\delta$ + durant els primers dies de vida observats en aquest treball, coincideix amb estudis histològics que mostren que les cèl·lules TCR $\gamma\delta$ + estan presents a l'epiteli de rates neonates (Helgeland i col., 1997a i b). Les cèl·lules TCR $\gamma\delta$ + apareixen abans que els limfòcits TCR $\alpha\beta$ + en sang perifèrica durant la vida fetal en diverses espècies, com porcs (Sinkora i col., 1998), ratolins (Pardoll i col., 1987) i pollastres (Chen i col., 1988). A més a més de l'activitat citolítica, els IEL TCR $\gamma\delta$ + poden exercir funcions específiques en els diferents estadis del desenvolupament, ja que s'ha postulat que intervenen en el desenvolupament mucosal dels limfòcits B (Komano i col., 1995; Fujihashi i col., 1996), i que tenen una influència en la proliferació i diferenciació de les cèl·lules epitelials mitjançant la secreció de citocines i factors de creixement (Kagnoff, 1998). D'altra banda, les cèl·lules TCR $\gamma\delta$ +, amb un gran potencial immunoregulador autoespecífic, expressen un repertori de receptors antigènics el dia de naixement que pot estar relacionat amb la defensa mucosal en les primeres etapes de vida, quan la defensa mucosal antigen-específica, mediada per cèl·lules TCR $\alpha\beta$ +, no està totalment desenvolupada (Kagnoff,

1998). Tots aquests fets poden explicar la relativa gran proporció d'aquests IEL TCR $\gamma\delta$ +CD8+ observat des dels primers dies de vida.

A diferència dels LPL o d'altres teixits limfoides secundaris, el epiteli intestinal es caracteritza per la presència de DP CD8+CD4+. Aquesta població és quasi indetectable durant el període de lactància i s'expandeix després del deslletament i arriba a un 20% en rata adulta. S'ha descrit un increment similar dependent de l'edat d'aquestes cèl·lules en rates de 4, 10 i 30 setmanes d'edat amb diversos *backgrounds* genètics (Takimoto i col., 1992) i un considerable nombre de IEL CD8+CD4+ en rates Lewis d'edat avançada (Yamada i col., 1999).

D'acord amb els resultats presentats i com s'ha descrit prèviament (Ter Steege i col., 1997; Todd i col., 1999), els IEL CD4+CD8+ expressen les molècules CD3 i CD5, així com el TCR $\alpha\beta$. Se sap que aquests IEL proliferen espontàniament, però les seves característiques, origen i funcions romanen obscures (Takimoto i col., 1992). S'ha postulat que, en l'ambient de l'epiteli intestinal, que IEL CD4+ madurs procedents del timus, poden induir l'expressió de la molècula CD8 (Morrissey i col., 1995; Reimann i col., 1995) o bé que IEL CD8 $\alpha\alpha$ + són capaços de convertir-se en DP per adquisició de la molècula CD4 (Park i col., 2003). A més a més, els IEL CD4+CD8+ semblen representar cèl·lules memòria, ja que en humans, presenten el marcador CD45RO (Jarry i col., 1990) i, en rates, s'ha descrit que presenten una elevada expressió de CD44 (Yamada i col., 1999). En el nostre estudi, s'ha analitzat l'expressió d'aquesta molècula per tal de diferenciar les cèl·lules verges de les memòria (Swain i col., 1991), però no s'han observat canvis significatius durant el període de lactància. Encara que s'ha descrit que els IEL CD4+CD8+ són CD44^{high} (Yamada i col., 1999), en aquest treball no s'ha observat un augment de la proporció de cèl·lules CD8+CD44^{high} paral·lel a la del nombre de IEL CD4+CD8+. S'ha postulat que aquest tipus cel·lular DP pot estar involucrat en processos de maduració intestinal i desenvolupament, amb funcions en la immunitat innata i adaptativa (Reimann i col., 1995; Park i col., 2003).

D'altra banda, la proporció de IEL CD8+ que presenten la molècula CD90 (Thy-1), marcador que desapareix després dels primers estadis de maduració, només s'ha detectat el dia del naixement. Posteriorment, gairebé el 100% del IEL CD8+ no expressen CD90. Aquests resultats concorden amb estudis previs realitzats en ratolins per Klein (1986), qui mostra que la molècula Thy-1 es troba absent en gairebé un 70% dels IEL. A més a més, el nombre de IEL que expressen molècules activació com CD25, CD45RC, CD28 i CD71 tant en rates lactants com adultes no és significatiu, a diferència del que han observat alguns autors. En aquest sentit, Robjin i col. (1995) descriuen la presència d'una petita proporció de IEL CD25+ o CD71+ i Tood i col. (1999) en rates adultes de tipus Wistar Furth, demostren una considerable proporció de IEL CD25+, CD45RC+ i CD28+.

En contrast amb les cèl·lules T CD8+ perifèriques, tant els IEL com els LPL CD8+ poden expressar les cadenes $\alpha\alpha$ o $\alpha\beta$. La molècula CD8 $\alpha\alpha$ es descriu com a marcador de cèl·lules

timus-independents i, com a mínim en el cas de IEL, correspon a una població que es desenvolupa en el microambient intestinal i que expressa la molècula CD8 $\alpha\alpha$ de forma aïllada o en combinació amb la molècula CD4 i amb un repertori oligoclonal de TCR (Robijn i col., 1995; Nagler-Anderson, 2001). El fenotip de CD8 $\alpha\alpha$ ha estat descrit tant en cèl·lules intestinals de tipus TCR $\gamma\delta$ + com TCR $\alpha\beta$ + (Kagnoff, 1998, Lefrancois i col., 1995) així com en cèl·lules NK perifèriques i TCR $\alpha\beta$ + després de ser activades (Moebius i col., 1991). Els nostres estudis no mostren canvis significatius en la proporció de IEL CD8 $\alpha\alpha$ + o CD8 $\alpha\beta$ + durant el període de lactància i animal adult. En tots els animals lactants, el fenotip CD8 $\alpha\alpha$ és relativament més abundant que el fenotip CD8 $\alpha\beta$, de forma similar a l'adult (Helgeland i col., 1997).

Pel que fa als LPL durant la fase neonatal, la població CD8+ és principalment homodimèrica CD8 $\alpha\alpha$, a partir del dia 11, la proporció de cèl·lules CD8 $\alpha\beta$ + augmenta i assoleix percentatges d'edat adulta. Aquests resultats concorden amb aquests descrits per Boll i col. (1995) en ratolí.

La presència de la molècula CD5 també està associada amb el desenvolupament dependent de timus (Lefrancois, 1991). En aquest treball, s'ha posat de manifest que les cèl·lules CD5+ representen només una baixa proporció dels IEL CD8+ totals presents durant la lactància. Aquests resultats indiquen que un nombre substancial de IEL TCR $\alpha\beta$ +CD8+ no expressen CD5, tal i com s'ha descrit en altres estudis (Ter Steege i col., 1997), de forma diferencial als limfòcits perifèrics. Les cèl·lules CD5- es poden correspondre amb els IEL i LPL CD8 $\alpha\alpha$ +

En el cas de LPL CD8+, la presència de la molècula CD5 incrementa de forma paral·lela a la subpoblació CD8 $\alpha\beta$, fet que permet de nou l'associació entre LPL CD8+ presents en els primers dies de vida amb un desenvolupament timus-independent, relacionat amb cèl·lules CD5- CD8 $\alpha\alpha$ +

D'altra banda, tota la població de IEL CD4+, incloent la subpoblació CD4+CD8+ en animals adults, coexpressa CD5, tal i com han descrit altres autors (Todd i col., 1999, Fangmann i col., 1991). Aquest fet, explica l'increment de la població de IEL CD8+CD5+ detectada en rates adultes. El fenotip CD4+CD8+ presenta la molècula CD8 $\alpha\alpha$ (Yamada i col., 1999), i per tant es podria pensar en un origen timus-independent, però en canvi, expressen la molècula CD5, com les cèl·lules derivades del timus. Aquests resultats confirmen la gran complexitat d'aquests fenotips i la dificultat d'associar de forma directa determinades molècules amb l'origen d'aquestes cèl·lules, posant de manifest la gran varietat de factors que influeixen en el desenvolupament dels limfòcits intestinals: estructures limfoides implicades, precursors, elements exògens com antígens alimentaris i microbians, elements endògens implicats en el procés de diferenciació i presentació de l'antigen, entre d'altres.

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, la proporció de limfòcits que presenten la molècula CD4 en el compartiment intraepitelial és molt baixa. Ara bé, aquesta proporció incrementa en l'edat adulta degut a l'aparició de cèl·lules DP. Pel contrari, pel que fa a l'ontogènia de LPL CD4+ en ili neonatal, en aquest estudi s'ha descrit que des del dia 11 aquestes cèl·lules expressen CD3, TCR $\alpha\beta$, CD2, CD5 i CD90 amb una proporció similar a la dels animals adults. En canvi, el percentatge de LPL CD4+ encara incrementa des de la tercera setmana de vida fins a l'edat adulta. Aquests resultats concorden amb el desenvolupament de forma paral·lela de les cèl·lules B durant la tercera setmana de vida, i és consistent amb l'important paper col·laborador sobre les cèl·lules B de la LP que porten a terme aquests limfòcits T CD4+. En relació a les molècules de superfície de LPL T CD4+, cal remarcar el paper que pot exercir el marcador CD2 en aquest compartiment. La molècula CD2 s'ha descrit com a coestimuladora necessària per a l'activació de LPL, de forma diferencial a les cèl·lules T sanguínies (James, 1999; Kelsall, 1999). D'altra banda, encara que la molècula CD25 està present en una petita proporció de LPL CD4+ en rates lactants, aquesta s'expressa àmpliament a l'edat adulta, fet que pot indicar l'estat d'activació adquirit després del deslletament. Aquestes cèl·lules CD4+CD25+ de la LP podrien ser cèl·lules T reguladores (Annacker i col., 2001) les quals podrien actuar inhibint la resposta immunitària enfront d'antígens alimentaris i microbiota, prevenint l'autoimmunitat i la resposta inflamatòria. Cal destacar però, que s'ha descrit que la molècula CD25 en LPL pot reflectir un estat diferent d'activació o diferenciació quan es comparen amb limfòcits activats de sang perifèrica. En el compartiment sanguini aquestes cèl·lules proliferen, mentre que en el cas de LPL T CD25+ la proliferació és un fenomen poc usual (Zeitz i col., 1991). A més a més, els LPL semblen tenir una intensitat d'expressió de la molècula CD25 molt baixa, (Haverson i col., 1999), indicant que, o encara no han experimentat el seu estat de màxima activació o que pel contrari són cèl·lules amb un avançat estat d'activació, on la molècula CD25 pràcticament ja s'ha perdut (Yang i col., 1996). El fenotip madur de LPL CD4+ també es confirma per la desaparició de la molècula CD90, marcador negatiu per estats primerencs de maduració (Kroese, 1998).

La participació de les cèl·lules B, com a població efectora en la defensa de la mucosa intestinal està restringida a la LP, ja que és absent en l'epiteli intestinal. Durant les primeres dues setmanes de vida, només es detecta una baixa proporció de cèl·lules B tot i que aquesta incrementa durant la tercera setmana fins a valors equivalents als de l'animal adult. Aquests LPL són sIg+ CD45RA+ i no expressen sIgA. En canvi, de forma paral·lela, la proporció de cèl·lules sIgA+ (principalment CD45RA-), més granulars que els limfòcits, incrementen en la LP durant tot el període de lactància. D'altra banda, les cèl·lules de la LP inicien la síntesi d'IgM a partir de la segona setmana de vida i, de forma més tardana s'inicia la d'IgA, encara que de forma molt feble. Com era d'esperar, la relació de IgM-SC/IgA-SC a la LP s'inverteix en animals adults. Aquests canvis apareixen de forma tardana en el període de lactància, i podrien reflectir els canvis que estan succeint en la dieta en aquest període. En aquest sentit, estudis en ratolí han demostrat la dependència d'Ig-SC amb el procés de colonització bacteriana en l'intestí prim durant a les 3 setmanes de vida

(van der Heijden i col., 1989). Les cèl·lules B verges en els teixits mucosals presenten sIgD i sIgM i després de ser estimulades presenten sIgA or sIgG (Spencer i col., 1990). Aquests tipus de receptors es mantenen quan les cèl·lules es transformen en cèl·lules memòria, però es perden gradualment i conjuntament a d'altres marcadors de cèl·lules B, durant la diferenciació a cèl·lules plasmàtiques (Farstad i col., 2000; Brandtzaeg, 2001). D'acord amb aquests fets, els presents resultats permeten indicar que a la LP de rates neonates, la proporció de cèl·lules B verges (CD45RA+, sIg+ i sIgA-) incrementa i assoleix valors d'adult als 21 dies. Aquest mateix procés de desenvolupament s'ha descrit en humans per a les cèl·lules de la LP sIgA+, que poden ser formes blàstiques de limfòcits B (Farstad i col., 2000). En canvi, en la fase de deslletament, la capacitat secretora d'Ig és molt baixa en comparació a l'edat adulta, i el nombre d'IgM-SC és més abundant que d'IgA-SC. Aquests resultats estan d'acord amb els descrits en humans durant els primers estadis de vida, en els que les IgM-SC intestinals prevaleixen sobre les IgA-SC (Perkkio i col., 1980; Husband et al., 1996), i amb els que descriuen que a les 12 setmanes d'edat les IgA-SC predominen en la LP intestinal (Brandtzaeg, 1998; Farstad i col., 2000). Així, en la LP, les IgM-SC constitueixen un element important de la barrera mucosal durant els primers dies de vida. Aquesta classe d'Ig pot ser secretada al lumen intestinal, ja que tant la cadena J, pèptid responsable de la polimerització de les Ig, com el component secretor de l'epiteli es sintetitzen durant el període de gestació. Aquesta maquinària està preparada, doncs, per a secretar IgM, de forma similar a la d'IgA (Husband i col., 1996; Cripps i col., 1999). D'altra banda, el present estudi també mostra la presència pràcticament indetectable d'IgG-SC en rates lactants o adultes, d'acord amb els resultats descrits en LP intestinal humana (Shanahan, 1994).

En aquest treball, d'altra banda, s'ha estudiat la diferència entre la part proximal i distal de l'intestí prim, per tal d'avaluar si els IEL es desenvolupen de forma regional específica durant el període de lactància. S'han trobat diverses diferències entre les dues regions estudiades durant la primera setmana de vida. En particular, l'epiteli intestinal proximal presenta un percentatge total de cèl·lules NK superior al del distal, degut a una elevada proporció de la subpoblació de IEL NKR-P1A+CD8+. A més a més, l'intestí proximal mostra una proporció de IEL CD3+CD8+ inferior respecte la part distal, fenomen possiblement degut a la disminució de la subpoblació de IEL TCR $\alpha\beta$ +CD8+. Aquesta distribució suggereix diferències regionals durant els primers 7 dies de vida, consistents en un predomini de la immunitat innata en intestí prim proximal, i de la resposta immune adquirida en la part distal .

En resum, el present estudi mostra com la composició de IEL i LPL varia durant el període de lactància en la majoria de subpoblacions estudiades. Algunes d'aquestes modificacions tenen lloc precoçment, durant la primera setmana de vida, i d'altres al llarg del període de lactància. Durant la primera setmana de vida, els canvis en les poblacions de IEL consisteixen en un enriquiment de cèl·lules CD45+, NKR-P1A+ i CD8+. Aquestes primeres

modificacions van acompanyades de variacions en determinats fenotips específics: els IEL CD8⁺ mostren una disminució en la coexpressió de TCR $\gamma\delta$, CD2, CD5 i CD90, mentre que els IEL NKR-P1A+CD8⁺ incrementen. Paral·lelament, en aquest mateix primer període, hi ha una gran presència de cèl·lules timus-independents en la LP, cèl·lules CD8 $\alpha\alpha$ +CD5⁻ i de cèl·lules NK CD8⁺, que participen en la resposta immune innata durant el desenvolupament del GALT. D'altra banda, alguns fenotips mostren una associació edat-dependent i actuen com a marcadors de maduració en el desenvolupament tant de IEL com de LPL. De forma global, existeixen diferents patrons de desenvolupament entre les poblacions de IEL CD8+TCR $\alpha\beta$ +, CD8+TCR $\gamma\delta$ + i CD8+NKR-P1A+. Els IEL CD8⁺ presenten un increment en la proporció de les cèl·lules TCR $\alpha\beta$ + i una disminució del percentatge de cèl·lules que presenten el receptor NKR-P1A. Aquests canvis són deguts a un interessant comportament de les cèl·lules NK intraepiteliales, les quals a partir d'un fenotip convencional (NKR-P1A+CD8⁺), presenten un fenotip característic intestinal (NKR-P1A+CD8⁻), que també està present en la LP. D'altra banda, al final del període de lactància, hi ha un dramàtic increment de cèl·lules B i de cèl·lules secretores d'Ig a la LP, així com de la consolidació del fenotip madur de LPL CD4⁺. Però, tot i els canvis aquí descrits durant el període de lactància, en el moment del deslletament, el patró fenotípic i secretor de IEL i LPL encara del que es presenta en animals adults. Un dels canvis més importants observats és l'aparició tardana de la subpoblació de IEL CD8+CD4⁺, els quals expressen les molècules CD3⁺ i CD5⁺. A més a més, després de les 3 setmanes de vida, la població total de cèl·lules NK disminueix, per tant la relació entre les subpoblacions de IEL CD8+ TCR $\alpha\beta$ + i NKR-P1A+ encara continua incrementant. Així, les poblacions limfocítiques en el compartiment intestinal presenten una sèrie de canvis fenotípics associats amb la primera ingesta de menjar, encara que els canvis continuen quan l'intestí s'exposa a nous antígens procedents de la dieta sòlida o de l'ambient microbià fins a assolir proporcions de limfòcits madurs en l'edat adulta. El patró de desenvolupament en l'intestí prim, definit pels canvis fenotípics observats en IEL i LPL, així com la capacitat secretora en el cas de LPL, pot ser d'utilitat com a referència en l'avaluació de l'efecte de fàrmacs, probiòtics o suplementes dietètics sobre el paper d'aquestes poblacions efectores del GALT durant el període de lactància. La influència de nutrients i no-nutrients sobre el procés de maduració limfocítica intestinal encara requereix ser investigat.

Una cop descrites les principals variacions fenotípiques de les poblacions efectores intestinals, IEL i LPL, durant el període de lactància, l'estudi es va centrar en esbrinar l'origen i el desenvolupament d'una subpoblació limfocítica específica del compartiment mucosal, concretament els IEL CD8 $\alpha\alpha$ +TCR $\alpha\beta$ +. Per assolir aquest objectiu, i donada la gran complexitat fenotípica en aquest compartiment ha estat necessària la utilització de models murins transgènics. Concretament, s'han emprat animals immunocompromesos i

transgènics per al receptor específic TCR H-Y, que únicament presenten limfòcits T que expressen el mateix TCR, a diferència dels ratolins convencionals on l'especificitat antigènica dels limfòcits és àmpliament heterogènia.

En primer lloc, i per tal d'aprofundir en l'estudi del desenvolupament de IEL, s'han examinat les cinètiques d'aparició de les subpoblacions de limfòcits CD8 $\alpha\beta$ +, CD8 $\alpha\alpha$ + i CD8- a l'epiteli intestinal durant les setmanes 2 i 5 de vida postnatal i en resposta a senyals agonistes a través del TCR. Aquest estudi posa de manifest que, independentment de la configuració del MHC, a les dues setmanes de vida, una petita proporció de IEL ja presenta la molècula CD8 $\alpha\alpha$, tot i que l'expansió o diferenciació d'aquesta població no té lloc fins a una etapa més tardana. En canvi, els IEL CD8 $\alpha\beta$ + ja estan presents a les primeres setmanes de vida. La baixa proporció de IEL CD8 $\alpha\alpha$ + en les primeres fases del desenvolupament incrementa en resposta al tractament amb el pèptid agonista o amb AcMo anti-CD3 en ambdues línies de ratolins transgènics. Així, l'escassetat dels IEL CD8 $\alpha\alpha$ + en els primers dies de vida pot ser degut tant a causes intrínseques com extrínseques, com l'afluència de nous Ag. L'expansió tardana dels IELs CD8 $\alpha\alpha$ + demostrada en aquest treball, està d'acord amb estudis desenvolupats en ratolins $\alpha_E^{-/-}$ per Schon i col., (1999), els quals suggereixen que l'etapa de màxim desenvolupament de IEL CD8 $\alpha\alpha$ + és al voltant de les 3-4 setmanes i no en fases precoces. A més a més, el desenvolupament postnatal de les diferents subpoblacions de IEL en els ratolins transgènics TCR H-Y i concretament l'aparició dels IEL CD8 $\alpha\alpha$ +, mostren la implicació de la interacció MHC-Ag-TCR en el desenvolupament d'aquesta subpoblació de limfòcits intraepiteliais. En estudis realitzats en ratolins no transgènics, és a dir, amb un repertori de TCR no restrictiu, s'ha demostrat també un desenvolupament tardà de la població epitelial CD8 $\alpha\alpha$ + (Camerini i col., 1993). Malgrat tot, a causa de la gran heterogeneïtat del repertori de TCR en aquests ratolins és difícil associar el desenvolupament de IEL CD8 $\alpha\alpha$ + a un procés dirigit per l'antigen.

Els resultats obtinguts plantegen la incògnita sobre l'origen dels IEL CD8 $\alpha\alpha$ +, tema sobre el que hi ha molta controvèrsia. És ben sabut que l'afinitat entre les interaccions TCR-Ag-MHC determina el procés de selecció tímica, de forma que la baixa afinitat permet la supervivència i selecció positiva, i l'alta afinitat comporta la selecció negativa i consegüentment la delecció cel·lular (Sebzda i col., 1999). Encara que aquest paradigma està ben acceptat en timus, s'ha proposat que la selecció de IEL CD8 $\alpha\alpha$ + intestinals pot seguir un patró oposat a aquest i, per tant, aquestes cèl·lules derivarien de precursors que escaparien al procés de selecció tímica negativa. En base a aquestes premisses es planteja: quin tipus de precursors són alliberats pel timus com possibles precursors dels IELs CD8 $\alpha\alpha$ +/ Quina és la via ontogènica implicada i quins factors hi intervenen?

Una primera explicació a aquestes qüestions pot ser que els IEL CD8 $\alpha\alpha$ + derivin de processos externs al timus, potser de cèl·lules precursors que arriben directament de la medul·la òssia, sense cap tipus de selecció tímica, i que a l'intestí siguin seleccionats de

forma diferent a la descrita en el timus durant les primeres etapes de la vida. Aquest procés podria donar-se a les criptoplaques, on s'han trobat precursors CD3⁻ (Kanamori i col., 1996; Saito i col., 1998) i expressió d'activitat RAG (Guy-Grand i col., 1992; Lin i col., 1994). En aquest sentit, la transferència de criptoplaques a animals immunodeficients incrementa la població de IEL CD8 $\alpha\alpha$ +. A més a més, la timectomia origina la disminució d'aquesta població intestinal (Saito i col., 1998; Suzuki i col., 2000). Tots aquests fets suggereixen que el desenvolupament dels IEL CD8 $\alpha\alpha$ + o com a mínim una part d'ells, són timus-independents. Actualment s'accepta que aquest procés és una possible via menor però l'única responsable de la generació de IEL CD8 $\alpha\alpha$ + (Guy-Grand i col., 2003).

Una segona explicació sobre l'origen dels IEL CD8 $\alpha\alpha$ + podria ser que aquests limfòcits derivessin de progenitors que no han rebut cap tipus de selecció, desenvolupats en el timus de forma primerenca en la vida postnatal i que posteriorment serien induïts a una expansió i diferenciació de forma més tardana o en l'edat adulta. Aquesta teoria està recolzada per la disminució del nombre total de IEL, concretament de cèl·lules CD8 $\alpha\alpha$ +, que presenten animals timectomitzats durant l'etapa neonatal en comparació amb animals timectomitzats durant la vida adulta (Bandeira i col., 1991; Guy-Grand i col., 1991).

Una tercera explicació suggereix que, interaccions de gran afinitat entre el pèptid agonista i el TCR a nivell tímic, podrien generar cèl·lules T o precursors que migrarien preferentment cap a l'intestí on serien induïts a expandir-se i completar la seva diferenciació. Per tant, els precursors dels limfòcits CD8 $\alpha\alpha$ + en l'intestí serien cèl·lules DN o potser CD8 $\alpha\beta$ ^{low}, que escaparien de la selecció negativa al timus (Guy-Grand i col., 2001).

La quarta teoria contempla la possibilitat que el model transgènic de TCR H-Y mimetitzí la via de desenvolupament de les cèl·lules T $\gamma\delta$ (Bruno i col., 1996; Robey i col., 1998; Terrence i col., 2000). Això podria ser degut a que en els models transgènics, com els ratolins TCR H-Y, l'expressió del transgen té lloc de forma molt precoç a l'ontogènia, quan en el timus s'estan desenvolupant pro- o pre-timòcits, fet que impediria el desenvolupament normal de la resta de TCR, fins i tot de les cèl·lules $\gamma\delta$ (Borguiya i col., 1992; Pénit i col., 1995; Terrence i col., 2000).

En aquest treball hem demostrat la importància de la presència de l'antigen per al desenvolupament dels limfòcits intraepiteliais intestinals CD8 $\alpha\alpha$ +. Malgrat tot, no es poden descartar altres factors lligants o solubles. De fet, en l'expansió de les cèl·lules CD8 $\alpha\alpha$ + s'ha descrit la importància de diferents factors solubles produïts per l'epiteli intestinal, com el SCF (*Stem Cell Factor*) (Puddington i col., 1994), la IL-15 (Kennedy i col., 2000; Ma i col., 2000) i la IL-7 (Fujihashi i col., 1996; Suzuki i col., 1997; Laky i col., 1998). Una altra possibilitat consisteix en la implicació de molècules MHC classe I no clàssiques com és el TL. S'ha descrit que aquesta molècula interacciona exclusivament i amb elevada afinitat

amb cèl·lules CD8 $\alpha\alpha$ +, induint la seva activació i proliferació (Leishman i col., 2001; Tsujimura i col., 2001). Així, podria ser que el TL retingués i reforçés la presència de cèl·lules T CD8 $\alpha\alpha$ + que ja estarien presents des de les primeres etapes de vida, o que potenciés senyals ambientals que no serien suficients per a la supervivència i expansió de la subpoblació de IEL CD8 $\alpha\alpha$ + durant les primeres setmanes de vida. De qualsevol manera, la conversió de precursors en cèl·lules CD8 $\alpha\alpha$ + és un procés d'estimulació local originat exclusivament en l'ambient intestinal, degut a la presència de l'antigen i probablement associat a d'altres factors (Guy-Grand i col., 2001).

Aquest estudi demostra que, en el timus de ratolins mascle TCR H-Y de dues setmanes d'edat, la majoria de cèl·lules DP i CD8+ presenta la molècula CD8 $\alpha\alpha$, encara que com ja s'ha comentat a aquesta edat la majoria de IEL són CD8-. L'existència de cèl·lules CD8 $\alpha\alpha$ + en el timus no sembla estar relacionada amb l'expansió de cèl·lules CD8 $\alpha\alpha$ + a l'intestí, ja que aquests limfòcits T CD8 $\alpha\alpha$ + desapareixen del timus de ratolí mascle transgènic TCR H-Y a les 3 setmanes d'edat, mentre que la proporció de IEL CD8 $\alpha\alpha$ + continua incrementant fins a les 5 setmanes d'edat. Així, per tant, la cinètica de desaparició tímica i l'aparició intestinal de les cèl·lules CD8 $\alpha\alpha$ + suggereix que els IEL CD8 $\alpha\alpha$ + no deriven de cèl·lules CD8 $\alpha\alpha$ + tímiques. D'altra banda, els nostres resultats demostren que limfòcits intestinals CD8- són precursors de IEL CD8 $\alpha\alpha$ +, tot i que no es pot descartar que IEL CD8 $\alpha\beta$ + també puguin actuar com a precursors de IEL CD8 $\alpha\alpha$ +, sota condicions ambientals adequades.

Per altra banda, en aquest treball s'ha demostrat, en ratolins TCR H-Y, la presència de limfòcits CD8 $\alpha\beta$ + perifèrics capaços de reconèixer l'antigen propi Smcy, àmpliament expressat en ratolins mascles. Aquestes cèl·lules normalment són delecionades en el timus (Levelt i col., 1999), ja que són potencialment autoreactives. Es pot especular que les cèl·lules T autoreactives podrien ser necessàries en les primeres etapes de vida per tal d'induir i mantenir un estat d'homeòstasi immunitària. Després d'un determinat període (2-4 setmanes) es posarien en funcionament els mecanismes encarregats d'inactivar i eliminar aquestes cèl·lules T de la perifèria. En aquest sentit, els nostres resultats mostren que la delecio o modificació de les cèl·lules T esplèniques autospecífiques és un fenomen que succeeix en el mateix període que la fase d'expansió dels IEL CD8 $\alpha\alpha$ + a l'intestí, fet que suggereix que l'intestí presenta l'habilitat de capturar i modificar aquestes cèl·lules autospecífiques. Tot i que, no està clar com aquestes cèl·lules T CD8+ autoreactives són tolerades a l'intestí podria ser similar al mecanisme pel qual el timus no deleciona les cèl·lules T CD8 $\alpha\beta$ + a l'etapa perinatal.

S'ha suggerit que la generació de cèl·lules CD8 $\alpha\alpha$ + en l'epiteli intestinal requereix d'un procés de selecció tímica que depèn de la presència de l'antigen agonista en el timus (Rocha i col., 1992; Poussier i col., 1993 Cruz i col., 1998). Estudis previs realitzats per la Dra. Camerini (Universitat de Irvine, Califòrnia) suggereixen que tot i que físicament cal l'òrgan tímica per al desenvolupament de IEL, no es requereix la presència de l'antigen

agonista. Aleshores es va analitzar si la presència tímica del senyal agonista (antigen reconegut amb alta afinitat pel TCR), pèptid Smcy en el cas del receptor H-Y, era necessària per al desenvolupament de limfòcits CD8 $\alpha\alpha$ + a l'epiteli intestinal. Per tal de portar a terme aquest objectiu, en aquest treball s'ha creat una línia doble transgènica de ratolins TCR H-Y que, en les femelles, expressen l'epítot Smcy de forma exclusiva a l'epiteli intestinal i per tant no l'expressen en el timus.

Les femelles doble transgèniques presenten una sèrie de canvis en resposta a l'expressió intestinal de l'antigen agonista. Així, de forma similar als mascles TCR H-Y, la majoria de IEL presents a l'epiteli d'intestí prim són CD8 $\alpha\alpha$ + (~70%), fet que demostra que l'expressió de l'agonista de forma exclusivament epitelial, i no al timus, és suficient per al desenvolupament d'aquest subtipus cel·lular. Aquest canvi en el fenotip limfocitari de les subpoblacions de IEL, és ben patent quan es compara amb les proporcions habituals de la femella TCR H-Y (~17% d'IELs CD8 $\alpha\alpha$ +, ~18% de CD8 $\alpha\beta$ + i ~55% de CD8-). L'expressió del marcador d'activació precoç CD69, així com de la integrina intestinal $\alpha\epsilon\beta_7$, és similar entre els IEL CD8 $\alpha\alpha$ + de la femella doble transgènica Smcy TCR H-Y, la femella TCR H-Y, i el mascle TCR H-Y convencional. Així, tot i que els IELs CD8 $\alpha\alpha$ + generats en el mascle TCR H-Y convencional són similars fenotípicament als IEL desenvolupats en el nostre model d'expressió exclusivament perifèrica de l'agonista, encara resta per determinar el seu perfil funcional.

D'altra banda el nombre total de IEL en la femella doble transgènica és superior al nombre que presenta la femella convencional TCR H-Y però inferior al que mostra el mascle TCR H-Y. Per tant, l'expressió del transgen Smcy a nivell intestinal no és suficient per assolir el nombre de població total de IEL. En aquest sentit, es pot dir que, en aquest model s'aconsegueix la diferenciació dels precursors en IELs CD8 $\alpha\alpha$ + a nivell intestinal, però no la seva expansió, que possiblement està dirigida per l'acció d'altres molècules diferents del pèptid agonista, com pot ser TL.

El timus de les femelles doble transgèniques és normal, amb un patró de selecció positiva similar al de la femella TCR H-Y, que permet la supervivència del llinatge CD8 $\alpha\beta$ +, tal i com queda reflectit per la seva presència en la melsa. Aquest fet demostra que el procés de selecció positiva al timus no és excloent en la generació de IEL CD8 $\alpha\alpha$ + en intestí de forma eficient com altres autors han postulat (Cruz i col., 1998, Guy-Grand i col., 2001). També evidència que l'antigen expressat a l'intestí no migra cap al timus, ja que en aquest cas, s'observaria un patró fenotípic de delecció i selecció negativa en el timus, amb una elevada proporció de cèl·lules DP i absència de limfòcits CD8 $\alpha\beta$ + a la perifèria com s'observa en el mascle TCR H-Y.

En resum en aquest treball, s'ha posat de manifest la maduració fenotípica i de la capacitat secretora d'Ig durant les primeres setmanes després del naixement en el sistema immunitari de la mucosa de l'intestí prim. Aquesta primera etapa de la vida es caracteritza per un predomini de cèl·lules NK tant en l'epiteli com en la làmina pròpia intestinals, però ràpidament, amb la introducció de nous antígens alimentaris el fenotip limfocític evoluciona a un patró de limfòcits TCR $\alpha\beta$ +. En aquest moment també apareix la secreció d'IgM a nivell mucosal mentre que la secreció d'IgA s'inicia de forma més tardana. D'altra banda, s'ha demostrat un possible origen dels limfòcits intraepiteliais CD8 $\alpha\alpha$ + que es concreta en un patró extratímic, derivat de limfòcits CD8- i dirigit específicament per l'antigen a nivell intestinal.

CONCLUSIONS



- En el període de lactància de rates Lewis es produeixen una sèrie de canvis fenotípics en les cèl·lules efectores del teixit limfoide associat a l'intestí prim, tant a l'epiteli com a la làmina pròpia.
- En el compartiment intraepitelial de l'intestí prim, la població cel·lular NK predomina sobre altres poblacions durant les primeres etapes de vida de les rates lactants. Concretament, les cèl·lules NK de fenotip CD8+ són les més abundants en aquest període a diferència de l'edat adulta quan la proporció de cèl·lules NK és molt baixa i majoritàriament presenten el fenotip CD8-.
- De la mateixa manera però amb uns nivells inferiors, la proporció de cèl·lules NK a la làmina pròpia durant el període de lactància és superior a la present en l'adult i també predomina el fenotip CD8+ durant les primeres dues setmanes de vida a diferència dels animals adults.
- A la làmina pròpia, l'abundància relativa de cèl·lules NK CD8+ juntament amb limfòcits TCR $\alpha\beta$ +CD8+ durant el període de lactància, implica que el percentatge total de cèl·lules CD8+ sigui superior al de limfòcits CD4+, els quals predominen a la vida adulta.
- El dia del naixement, en el compartiment intraepitelial, existeixen limfòcits TCR $\alpha\beta$ +, TCR $\gamma\delta$ + i NKR-P1A+, els quals segueixen patrons de desenvolupament diferents i característics en funció de l'edat.
- L'epiteli intestinal durant la lactància es caracteritza per l'absència de limfòcits DP, cèl·lules que s'expandeixen després del deslletament i arriben a constituir una cinquena part dels limfòcits intraepitelials a l'edat adulta.
- En ambdós compartiments efectors (intraepitelial i làmina pròpia), els limfòcits CD8+ expressen majoritàriament la molècula en la forma homodimèrica CD8 $\alpha\alpha$ tant durant la lactància com en l'edat adulta. A la làmina pròpia, la proporció CD8 $\alpha\alpha$ /CD8 $\alpha\beta$ durant les tres primeres setmanes de vida és superior que en l'edat adulta.
- L'estudi dels limfòcits intraepitelials CD8+ ha confirmat l'associació establerta entre els marcadors CD8 $\alpha\alpha$ i CD5 respecte el seu origen tímic també durant el període de lactància.

- Durant les primeres dues setmanes de vida, la presència de limfòcits B en el teixit limfoide associat a l'intestí prim és molt baixa, encara que a l'edat de deslletament, la proporció de cèl·lules B assoleix els valors d'adult. Aquests limfòcits es caracteritzen per no presentar IgA de superfície, mentre que cèl·lules sIgA+ augmenten progressivament durant la lactància.
- L'intestí prim de rates lactants comença la síntesi d'immunoglobulines la segona setmana de vida, sent inicialment IgM i posteriorment IgA. La relació entre cèl·lules secretores de IgM i IgA és inversa durant la lactància que a la vida adulta. En canvi, no s'han trobat cèl·lules secretores d'IgG durant les primeres etapes de vida.
- En ratolins transgènics MHC F1 i TCR H-Y s'ha establert el patró d'evolució de limfòcits intraepiteliais durant les primeres etapes de vida. Durant aquestes primeres fases en les quals augmenta el nombre total de cèl·lules CD8+, en ambdós models existeix una aparició tardana de la subpoblació CD8 $\alpha\alpha$ + respecte a la presència de limfòcits CD8 $\alpha\beta$ +. L'expansió de limfòcits CD8 $\alpha\alpha$ + es produeix com a resultat de la disminució de cèl·lules CD8-.
- A diferència de l'animal adult, durant les primeres etapes de vida els ratolins mascles TCR H-Y són capaços de retenir cèl·lules DP al timus i, en conseqüència, apareixen limfòcits CD8 $\alpha\beta$ + a la melsa i de forma precoç a l'intestí. En el cas del model MHC F1 les proporcions limfocítiques en timus i melsa no presenten variacions entre les primeres etapes de desenvolupament i l'edat adulta.
- La població limfocítica DP i CD8+ present en el timus de ratolins TCR H-Y presenta, de forma sorprenent, una elevada proporció de cèl·lules CD8 $\alpha\alpha$ + durant les primeres setmanes de vida que disminueix de forma paral·lela a la població DP amb el procés d'invulsió tímica.
- L'acceleració en el desenvolupament de limfòcits CD8 $\alpha\alpha$ + en el compartiment epitelial de l'intestí prim requereix la seva estimulació, ja sigui inespecífica o específica, mitjançant l'increment de la presència antigènica produïda per l'administració del pèptid agonista en ratolins MHC F1 i TCR H-Y.
- S'ha demostrat *in vitro*, la capacitat intrínseca dels IEL CD8- com a precursors de cèl·lules CD8 $\alpha\alpha$ +. El senyal agonista a través del TCR és suficient per dirigir aquesta diferenciació. Pel contrari, en les mateixes condicions, els limfòcits esplènics CD8- i CD8 $\alpha\beta$ + i els IEL CD8 $\alpha\beta$ + no son capaços de diferenciar-se en cèl·lules CD8 $\alpha\alpha$ +
- La generació de la doble línia transgènica Smcy TCR H-Y que expressa l'antigen agonista exclusivament a l'intestí, permet concloure que el desenvolupament de limfòcits intraepiteliais CD8 $\alpha\alpha$ + no requereix la presència de l'antigen agonista en el timus. En canvi, la presència de l'antigen a l'intestí és suficient per dirigir l'expansió dels limfòcits CD8 $\alpha\alpha$ + a l'epiteli intestinal.

- Les femelles de la doble línia transgènica presenten una proporció de IEL $CD8\alpha\alpha+$ similar a la dels mascles TCR H-Y i un procés de selecció positiva manifest per l'elevada presència de cèl·lules $CD8+CD4+$ en el timus i $CD8\alpha\beta+$ a la melsa, de forma similar a la de la femella TCR H-Y. Així, el desenvolupament de IEL $TCR\alpha\beta+CD8\alpha\alpha+$ autoespecífics i el procés de selecció positiva no són mútuament excloents per aquesta expansió cel·lular.
- En les femelles Smcy TCR H-Y, els IEL $CD8\alpha\alpha+$ presenten un fenotip similar al del model TCR H-Y tot i que en el model doble transgènic no s'assoleix la fase d'expansió observada en els mascles TCR H-Y.

BIBLIOGRAFIA



- Abuzakouk M, Carton J, Feighery C, O'Donoghue DP, Weir DG, O'Farrelly C. CD4+CD8+ and CD8+alpha+beta- T lymphocytes in human small intestinal lamina propria. *Eur J Gastroenterol* 1998; 10: 325-329.
- Allan CH, Menarick DL, Trier JS. Rat intestinal M cells contain acidic endosomal-lysosomal compartments and express class II major histocompatibility complex determinants. *Gastroenterology* 1993; 104: 698-708.
- Allen WD, Porter P. The relative frequencies and distribution of immunoglobulin-bearing cells in the intestinal mucosa of neonatal and weaned pigs and their significance in the development of secretory immunity. *Immunology* 1977; 32: 819-824.
- Altmann GG, Enesco M. Cell number as a measure of distribution and renewal of epithelial cells in the small intestine of growing and adult rats. *Am J Anat* 1967; 121: 319-336.
- Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Bandeira A. On the ontogeny and physiology of regulatory T cells. *Immunol Rev* 2001; 182: 5-17.
- Arstila T, Arstila TP, Calbo S, Selz F, Malassis-Seris M, Vassalli P, Kourilsky K, Guy-Grand D. Identical T cell clones are located within the mouse gut epithelium and lamina propria and circulate in the thoracic duct lymph. *J Exp Med* 2000; 191: 823-834.
- Banchereau J, Rousset F. Human Blymphocytes: phenotype, proliferation and differentiation. *Ann Rev Immunol* 1992; 52: 125-262.
- Bandeira A, Mota-Santos T, Itohara S, Degerman S, Heusser C, Tonegawa S, Coutinho A. Localization of gamma/delta T cells to the intestinal epithelium is independent of normal microbial colonization. *J Exp Med* 1990; 172: 239-244.
- Bandeira A, Itohara S, Bonneville M, Burlen-Defranoux O, Mota-Santos T, Coutinho A, Tonegawa S. Extrathymic origin of intestinal intraepithelial lymphocytes bearing T cell antigen receptor $\gamma\delta$. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 1988: 43-47.
- Barret T, Gajewski T, Danielpour D, Chang E. Differential function of intestinal intraepithelial lymphocyte subsets. *J Immunol* 1992; 149: 1124-1130.
- Beagley K, Husband A. Intraepithelial lymphocytes: origins, distribution, and function. *Crit Rev Immunol* 1998; 18: 237-254.
- Beagley KW, Fujihashi K, Lagoo AS, Lagoo-Deenadaylan S, Black CA, Murray AM, Sharmanov AT, Yamamoto M, McGhee JR, Elson CO, Kiyono H. Differences in intraepithelial lymphocyte T cell subsets isolated from murine small versus large intestine. *J. Immunol* 1995; 154: 5611-5619.
- Benacerraf B. Significance and biologic function of class II MHC. *Am J Pathol* 1985; 120: 334-343.
- Biennenstock J. The lung as an immunologic organ. *Ann Rev Med* 1984; 35: 49-62.
- Bland P. MHC class II expression by the gut epithelium. *Immunol Today* 1988; 9: 174-178.
- Bland PW, Whiting CV. Antigen processing by isolated rat intestinal villus enterocytes. *Immunology* 1989; 68: 497-502.

- Bland PW. Antigen presentation by epithelial cells of the rat small intestine I. Kinetics, antigen specificity and blocking by anti-Ia antisera. *Immunology* 1986; 58: 1-7.
- Bland PW. Antigen presentation by epithelial cells of the rat small intestine II. Selective induction of suppressor T cells. *Immunology* 1986; 58: 9-14.
- Bluthmann H, Kieselow P, Uematsu Y, Malissen M, Krimpenfort P, Berns A, von Boehmer H, Steinmetz M. T-cell specific deletion of T-cell receptor transgenes allows functional rearrangement of endogenous alpha- and beta- genes. *Nature* 1988; 334: 156-159.
- Boll G, Reimann J. Lamina propria T cell subsets in the small and large intestine of euthymic and athymic mice. *Scand J Immunol* 1995; 42: 191-201.
- Boll G, Rudolphi A, Spiess S and Reinmann J. Regional specialization of intraepithelial T cells in the murine small and large intestine. *Scand J Immunol* 1995; 41: 103-113.
- Borguiya P, Kishi H, Uematsu Y, von Boehmer H. Exclusion and inclusion of α and β T cell receptor alleles. *Cell* 1992; 69: 529-537.
- Brandtzaeg P, Baekkevold ES, Craig H. From B to A the mucosal way. *Nature Immunol* 2001; 2: 1093-1094.
- Brandtzaeg P, Bjerke K. Immunomorphological characteristics of human Peyer's patches. *Digestion* 1990; 46: 262-273.
- Brandtzaeg P, Farstad IN, Johansen FE, Morton HC, Norderhaug IN, Tamanaka T. The B-cell system of human mucosae and exocrine glands. *Immunol Rev* 1999; 171: 45-87.
- Brandtzaeg P, Nilssen DE, Rognum TO, Thrane P. Ontogeny of the mucosal immune system and IgA deficiency. *Gastroenterol Clin North Am* 1991; 20: 397-439.
- Brandtzaeg P. Development and basic mechanisms of human gut immunity. *Nutr Rev* 1998; 56: S5-S18.
- Brissette-Storkus C, Kaufman CL, Pasewicz L, Worsey HM, Lakomy R, Ildstad ST, Chambers WH. Characterization and function of the NKR-P1dim/T cell receptor- $\alpha\beta$ + subset of rat T cells. *J Immunol* 1994; 152: 388-396.
- Brodsky FM, Guagliardi LE. The cell biology of antigen processing and presentation. *Ann Rev Immunol* 1991; 9: 707-744.
- Bruce MG, Strobel S, Hanson DG, Ferguson A. Irradiated mice lose the capacity to "process" fed antigens for systemic tolerance of delayed hypersensitivity. *Clin Exp Immunol* 1987; 70: 611-618.
- Bruder MC, Spanhaak S, Bruijntjes JP, Michielsen CPPC, Vos JG, and Kuper CF. Intestinal T lymphocytes of different rat strains in immunotoxicity. *Toxicol Pathol* 1999; 27: 171-179.
- Bruno L, Felhing HJ, vonBoehmer H. The $\alpha\beta$ T cell receptor can replace the $\gamma\delta$ receptor in the development of $\gamma\delta$ lineage. *Immunity* 1996; 5: 343-352.
- Bucy RP, Chen CL, Cihak J, Losch U, Cooper MD. Avian T cells expressing $\gamma\delta$ receptors localize in the splenic sinusoids and the intestinal epithelium. *J Immunol* 1988; 141: 2200-2205.

- Bucy RP, Chen CL, Cooper MD. Tissue localization and CD8 accessory molecule expression of $T\gamma\delta$ cells in humans. *J Immunol* 1989; 142: 3045-3049.
- Buts JP. Les facteurs trophiques du lait. *Arch Pédiatr* 1998; 5: 298-306.
- Buzoni-Gatel D, Debbabi H, Moretto M, Dimier-Poisson IH, Lepage AC, Bout DT, Kasper LH. Intraepithelial lymphocytes traffic to the intestine and enhance resistance to *Toxoplasma gondii* oral infection. *Eur J Immunol* 1999; 162: 5846-5852.
- Camerini V, Panwala C, Kronenberg M. Regional specialization of the mucosal immune system: intraepithelial lymphocytes of the large intestine have a different phenotype and function than those of the small intestine. *J Immunol* 1993; 151: 1765-1776.
- Camerini V, Sydora B, Aranda R, Nguyen C, MacLean C, McBride H, Kronenberg M. Generation of Intestinal Mucosal Lymphocytes in SCID Mice Reconstituted with mature, thymus-Derived T Cells. *J Immunol* 1998; 160: 2608-2618.
- Carol M, Lambrechts A, Van Gossum A, Libin M, Goldman M, Mascart-Lemone F. Spontaneous secretion of interferon γ and interleukin 4 by human intraepithelial and lamina propria gut lymphocytes. *Gut* 1998; 42: 643-649.
- Castro GA, Powell D. The physiology of the mucosal immune system and immune-mediated responses in the gastrointestinal tract. In: Johnson LR, ed. *Physiology of the Gastrointestinal tract*. New York: Raven Press, 1994: 42-135.
- Catto-Smith AG, Ripper JL. Mucosal mast cells and developmental changes in gastric absorption. *Am J Physiol* 1995; 268: G121-G127.
- Cerf-Bensussan N, Guy Grand D. Intestinal intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterol Clin North Am* 1991; 20: 549-576.
- Cerf-Bensussan N, Jarry A, Brousse N, Lisowska-Gros-pierre B, Guy-Grand D, Griscelli C. A monoclonal antibody (HML-1) defining a novel membrane molecule present on human intestinal lymphocytes. *Eur J Immunol* 1987; 17: 1279-1285.
- Cerf-Bensussan N, Scheneberger EE, Bahn AK. Immunohistologic and immunoelectron microscopic characterization of the mucosal lymphocytes of human small intestine by the use of monoclonal antibodies. *J Immunol* 1983; 130: 2615-2622.
- Chardes T, Buzoni-Gatel D, Lepage A, Bernard F, Bout D. *Toxoplasma gondii* oral infection induces specific cytotoxic $CD8\alpha/\beta^+$ $T\gamma\delta$ gut intraepithelial lymphocytes, lytic for parasite-infected enterocytes. *J Immunol* 1994; 153: 4596-4603.
- Chen CL, Cihak J, Losch U, Cooper MD. Differential expression of two T cell receptors, TcR1 and TcR2, on chicken lymphocytes. *Eur J Immunol* 1988; 18: 539-543.
- Crabbe PA, Bazin H, Eyssen H, Heremans JF. The normal microbial flora as a major stimulus for proliferation of plasma cells synthesizing IgA in the gut. *Int Arch Allergy* 1968; 34: 362-375.
- Cripps AW, Gleeson M. Ontogeny of mucosal immunity and aging. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, eds. *Mucosal Immunology*. San Diego: Academic Press, 1999: 253-266.

- Croitoru K, Ernst PB. Leukocytes in the intestinal epithelium: an unusual immunological compartment revisited. *Reg Immunol* 1992; 4: 63-69.
- Crowley MP, Fahrer AM, Baumgonth N, Hampl J, Gutgemann I, Teyton L, Chiem Y. A population of murine $\gamma\delta$ T cells that recognize an inducible MHC class IB molecule. *Science* 2000; 287: 314-316.
- Cruz D, Sydora B, Hetzel K, Yakoub G, Kronenberg M, Cheroutre H. An opposite pattern of selection of a single T cell antigen receptor in the thymus and among intraepithelial lymphocytes. *J Exp Med* 1998; 2: 255-265.
- Cummins A, Steele TW, LaBrooy JT, Shearman DJC. Maturation of the rat small intestine at weaning: changes in epithelial cell kinetics, bacterial flora and mucosal immune activity. *Gut* 1988; 29: 1672-1679.
- Cummins AG, Eglinton BA, Gonzalez A, Robertson DM. Immune activation during infancy in healthy humans. *J Clin Immunol* 1994; 14: 107-115.
- Cummins AG, Munro GH, Miller HRP, Ferguson A. Association of maturation of the small intestine at weaning with mucosal mast cell activation in the rat. *Immunol Cell Biol* 1988; 66: 417-422.
- Cummins AG, Thompson FM. Postnatal changes in mucosal immune response: A physiological perspective of breast feeding and weaning. *Immunol Cell Biol* 1997; 75: 419-29.
- Da Silva J, de Sousa D, Carmaona D, Isaura J, Russo M, Monteiro N, Caetano A. Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. *Int Immunol* 2003; 15: 447-455.
- Davis CP, McAllister JS, Savage DC. Microbial colonization of the intestinal epithelium in suckling mice. *Infect Immun* 1973; 7: 666-672.
- De Witt RC, Kudsk KA. The gut's role in metabolism, mucosal barrier function, and gut immunology. *Infect Dis Clin North Am* 1999; 13: 465-481.
- Deusch K, Luling F, Reich K, Classem M, Wasner H, Pfeffer K. A major fraction of human intraepithelial lymphocytes simultaneously expresses $\gamma\delta$ T cell receptor, the CD8 accessory molecules, and preferentially uses the Vd I gen segment. *Eur J Immunol* 1991; 21: 1053-1059.
- Dobbins WO. Human intraepithelial lymphocytes. *Gut* 1986; 27: 972-985.
- Dunkley ML, Husband AJ. Distribution and functional characteristics of antigen-specific helper T cells arising after Peyer's patch immunization. *Immunology* 1987; 61: 475-482.
- Ebert EC. Intraepithelial lymphocytes: interferon gamma production and suppressor/cytotoxic activities. *Clin Exp Immunol* 1990; 82: 81-85.
- Ernst PB, Befus AD, Bienenstock J. Leukocytes in the intestinal epithelium: an unusual immunological compartment. *Immunol Today* 1985; 6: 50-55.
- Ernst PB, Clark DA, Rosenthal KL, Befus AD, Bienenstock J. Detection and characterization of cytotoxic T lymphocyte precursors in the murine intestinal intraepithelial leukocyte population. *J Immunol* 1986; 136: 2121-2126.

- Estrada G, Krasinski SD, Montgomery RK, Grand, García-Valero J, López-Tejero MD. Quantitative analysis of lactase-phlorizin hydrolase expression in the absorptive enterocytes of newborn rat small intestine. *J Cell Physiol* 1996; 167: 341-348.
- Fagarasan S, Kinoshita K, Muramatsu M, Ikuta K, Honjo T. In situ class switching and differentiation to IgA-producing cells in the gut lamina propria. *Nature* 2001; 413: 639-643.
- Fangmann J, Schwitzer R, Wonigeit K. Unusual phenotype of intestinal intraepithelial lymphocytes in the rat: predominance of T cell receptor α/β + /CD2- cells and high expression of the RT6 alloantigen. *Eur J Immunol* 1991; 21: 753-760.
- Farstad ID, Carlsen H, Morton C, Brandtzaeg P. Immunoglobulin A cell distribution in the human small intestine: phenotypic and functional characteristics. *Immunology* 2000; 101: 354-363.
- Ferguson A, Murray D. Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human jejunum. *Gut* 1971; 12: 988-994.
- Ferguson A, Siegler K. Intraepithelial lymphocyte mitosis in a jejunal biopsy correlates with intraepithelial lymphocyte count, irrespective of diagnosis. *Gut* 1986; 27: 675-679.
- Ferguson A. Intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *Gut* 1977; 18: 921-937.
- Fiocchi C. Mucosal Cellular Immunity. In: Targan SR, Shanahan F, eds. *Immunology and Immunopathology of the liver and the gastrointestinal tract*. New York: Igaku-Shoin, 170-138.
- Fujihashi K, McGhee JR, Kweon MN, Cooper MD, Tonegawa S, Takahashi I, Hiroi T, Mestecky J, Kiyono H. γ/δ T cell-deficient mice have impaired mucosal immunoglobulin A responses. *J. Exp. Med.* 1996; 183: 1929-1935.
- Fujihashi K, Kawabata S, Hiroi T, Yamamoto M, McGhee JR, Nishikawa SI, Kiyono H. Interleukin 2 (IL-2) and interleukin 7 (IL-7) reciprocally induce IL-7 and IL-2 receptors on $\gamma\delta$ T cell receptor-positive intraepithelial lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 3613-3618.
- Gebbers JO, Laissue JA. Postnatal immunomorphology of the gut. In: Hadziselimovic F, Herzog B, Bürgin-Wolff A, eds. *Inflammatory bowel disease and celiac disease in children*. Dordrecht: Kluwer Academic Pub, 1990: 3-4.
- Gelfanov V, Lai YG, Gelfanova V, Dong JY, Su JP, Liao NS. Differential requirement of CD28 costimulation for activation of murine CD8+ intestinal intraepithelial lymphocyte subsets and lymph node cells. *J Immunol* 1995; 155: 76-82.
- Glaister JR. Factors affecting the lymphoid cells in the small intestinal epithelium of the mouse. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1973; 45: 854-867.
- Göbel TWF, Kaspers B, Stangassinger M. NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken. *Int Immunol* 2001; 13: 757-762.
- Goodman T, Lefrancois L. Intraepithelial lymphocytes. Anatomical site, not T cell receptor form, dictates phenotype and function. *J Exp Med* 1989; 170: 1569-1581.
- Goodman T, Lefrancois L. Expression of the $\gamma\delta$ T Cell receptor on intestinal Cd8+ intraepithelial lymphocytes. *Nature* 1988; 333: 855-858.

- Gordon HA, Bruckner-Kardoss E. Effects of the normal microbial flora on various tissue elements of the small intestine. *Acta Anat* 1961; 44: 210-225.
- Gottesfeld Z, Abel EL. Maternal and paternal alcohol use: effects on the immune system of the offspring. *Life Sci* 1991; 48: 1-8.
- Gracey M. 1993. Intestinal Microflora. In: Gracey M, Burke V, eds. *Pediatric Gastroenterology and Hepatology*. Boston: Blacwell Science, 1993: 200-208.
- Groh V, Porcelli S, Fabbi M, Lanier LL, Picker LJ, Anderson T, Warnke RA, Bhan AK, Strominger JL, Brenner MB. Human lymphocytes bearing the T cell receptor $\gamma\delta$ are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J Exp Med* 1989; 169: 1277-1294.
- Guy-Grand D, Van den Broecke C, Briottet C, Malassis-Seris M, Selz F, Vassalli P. Different expression of the recombination activity gene RAG-1 in various populations of thymocytes, peripheral T cells and gut thymus-independent intraepithelial lymphocytes suggests two pathways of T cell receptor rearrangement. *Eur J Immunol* 1992; 22: 505-510.
- Guy-Grand D, Cerf-Bensussan N, Malissen B, Malassis-Seris M, Selz F, Vassalli P. Two gut intraepithelial lymphocyte populations with different T cell receptors: a role for the gut epithelium in T cell differentiation. *J Exp Med* 1991; 173: 471-481.
- Guy-Grand D, Griscelli C, Vasalli P. The mouse gut T lymphocyte, a novel type of T cell. Nature, origin, and traffic in mice in normal and graft versus-host conditions. *J. Exp. Med* 1978; 148: 1661-1677.
- Guy-Grand D, Malassis-Seris M, Briottet C, Vassalli P. Cytotoxic differentiation of mouse gut thymodependent and independent intraepithelial lymphocytes is induced locally: correlation between functional assays, presence of perforin and granzyme transcripts, and cytoplasmic granules. *J Exp Med* 1991; 173: 1549-1552.
- Guy-Grand D, Pardigon N, Darche S, Lantz O, Kourilsky P, Vasalli P. Contribution of double-negative thymic precursors to CD8 $\alpha\alpha^+$ intraepithelial lymphocytes of the gut in mice bearing TCR transgenes. *Eur J Immunol* 2001; 31: 2593-2602.
- Guy-Grand D, Azogui O, Celli S, Darche S, Nussenzweig MC, Kourilsky P, Vasalli P. Extrathymic T cell lymphopoiesis: ontogeny and contribution to gut intraepithelial lymphocytes in athymic and euthymic mice. *J Exp Med* 2003; 197: 333-356.
- Hamad M, Whetsell M, Wqang J, Klein JR. T cell progenitors in the murine small intestine. *Dev Comp Immunol* 1997; 21: 435-442.
- Haverson K, Bailey M, Stokes CR. T-cell populations in pig intestinal lamina propria: memory cells with unusual phenotypic characteristics. *Immunology* 1999; 96: 66-73.
- Hayday A, Theodoridis E, Ramsburg E, Shires J. Intraepithelial lymphocytes: exploring the third way in immunology. *Nature Immunol* 2001; 2: 997-1003.
- Hayday A. $\gamma\delta$ cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *A Rev Immunol* 2000; 18: 975-1026.
- Heijden PJ, Stok W, Bianchi TJ. Contribution of Immunoglobulin-secreting cells in the murine small intestine to the total "background" immunoglobulin production. *Immunology* 1987; 62: 551-555.

- Helgeland L, Brandtzaeg P, Rolstad B, Vaage JT. Sequential development of intraepithelial $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T lymphocytes expressing CD8 $\alpha\beta$ in neonatal rat intestine: requirement for the thymus. *Immunology* 1997; 92: 447-456.
- Helgeland L, Vaage JT, Rolstad B, Halstensen TS, Midtvedt T, Brandtzaeg P. Regional phenotypic specialization of intraepithelial lymphocytes in the rat intestine does not depend on microbial colonization. *Scand J Immunol* 1997; 46: 349-357.
- Henning SJ, Guerin MD. Role of diet in the determination of jejunal sucrase activity in the weanling rat. *Pediatr Res* 1981; 15: 1068-1072.
- Hershberg R, Eshtesady P, Sydora B, Brorson K, Cheroutre H, Modlin R, Kronenberg M. Expression of the Thymus Leukemia antigen in mouse intestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9727-9731.
- Hirata I, Berrebi G, Austin LL, Keren DF, Dobbins WO. Immunohistological characterization of intraepithelial and lamina propria lymphocytes in control ileum and colon and in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1986; 31: 593-603.
- Hogan B, Constantini F, Lacy E. Manipulating the mouse embryo. In: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1986: 79-187.
- Howie D, Spencer J, DeLord D, Pitzalis C, Wathen N, Dogan A, Akbar A, MacDonald T. Extrathymic T Cell differentiation in the human intestine early in life. *J Immunol* 1998; 161: 5862-5872.
- Hoyne GF, Askonas BA, Hetzel C, Thomas WR, Lamb JR. Regulation of house dust mite responses by inhaled peptide: transient activation precedes the development of tolerance in vivo. *Int Immunol* 1996; 8: 335-342.
- Husband AJ, Gleeson M. Ontogeny of Mucosal Immunity - Environmental and Behavioral influences. *Brain Behav Immun* 1996; 10: 188-204.
- Husby S, Jensenius J, Svehag SE. 1985. Passage of undegraded dietary antigen into the blood of healthy adults. Quantification, estimation of size, distribution, and relation of uptake to levels of specific antibodies. *Scand J Immunol* 1985; 22: 83-92.
- Iseki K, Kobayashi M, Miyazaki K. Spermidine uptake by rat intestinal brush border membrane vesicles. *Biochem Biophys Acta* 1991; 1068: 105-110.
- Itohara S, Nakanish N, Kanagawa O, Kube R, Tonegawa S. Monoclonal antibodies specific to native murine T-cell receptor $\gamma\delta$: analysis of $\gamma\delta$ T cells during thymic ontogeny and in peripheral lymphoid organs. *Proc Nat Acad Sci USA* 1989; 86: 5094-5098.
- James SP, Kiyono H. Gastrointestinal lamina propria T cells. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, eds. *Mucosal Immunology*. San Diego: Academic Press, 1999:381-396.
- Janeway CA, Jones B, Hayday A. Specificity and function of T cells bearing $\gamma\delta$ receptors. *Immunol Today* 1988; 9: 73-76.
- Janossy G, Bonfil M, Rowe D, Muir J, Beverly PCL. The tissue distribution of T Lymphocytes expressing different CD45 polypeptides. *Immunology* 1989; 66: 516-525.

- Janossy G, Tidman N, Selby WS, Thomas JA, Granger S, Kung PC, Goldstein G. Human T lymphocytes of inducer and suppressor type occupy different microenvironments. *Nature* 1980; 288: 81-84.
- Jarry A, Cerf-Bensussan N, Brousse N, Selz F, Guy-Grand D. Subsets of CD3+ (T cell receptor α/β or γ/δ) and CD3- lymphocytes isolated from normal human gut epithelium display phenotypical features different from their counterparts in peripheral blood. *Eur J Immunol* 1990; 20: 1097-1103.
- Jorgensen JL, Reay PA, Ehrida EW, Davis MM. Molecular components of T cell recognition. *Ann Rev Immunol* 1992; 10: 835-873.
- Kagnoff MF. Current concepts in mucosal immunity. III. Ontogeny and function of $\gamma\delta$ T cells in the intestine. *Am J Physiol* 1998; 274: G455-G458.
- Kanamori Y, Ishimaru K, Nanno M, Maki K, Ikuta K, Nariuchi H, Ishikawa H. Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit(+) IL-7R(+) Thy1(+) lymphohemopoietic progenitors develop. *J Exp Med* 1996; 184: 1449-1459.
- Kearsey JA, Stadnyk AW. Isolation and characterization of highly purified rat intestinal intraepithelial lymphocytes. *J Immunol Methods* 1996; 194: 35-48.
- Kelsall B, Strober W. Gut-associated lymphoid tissue. Antigen handling and T-lymphocyte responses. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, eds. *Mucosal Immunology*. San Diego: Academic Press, 1999: 293-317.
- Keren DF. Antigen processing in the mucosal immune system. *Semin Immunol* 1992; 4: 217-226.
- Keren DF. Mucosal IgA elaboration. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1989; 27: 159-177.
- Kilshaw PJ, Murrant SJ. A new surface antigen on intraepithelial lymphocytes in the intestine. *Eur J Immunol* 1990; 20: 2201-2207.
- Kisielow P, Bluthmann H, Staerz UD, Steinmetz M, von Boehmer H. Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature* 1988; 333: 742-746.
- Klein J, Moseley R. Intraepithelial lymphocytes, advances in host defence mechanisms. In: Kion H, McGhee J, eds. *Mucosal Immunology*. New York: Raven Press, 1993: 33-60.
- Klein JR. Ontogeny of the Thy-1-, Lyt-2+ murine intestinal intraepithelial lymphocyte. Characterization of a unique population of thymus-independent cytotoxic effector cells in the intestinal mucosa. *J Exp Med* 1986; 164: 309-314.
- Komano H, Fujiura Y, Kawaguchi M, Matsumoto S, Hashimoto Y, Obana S, Mombaerts P, Tonegawa S, Yamamoto H, Itohara S, Nanno M, Ishikawa H. Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial $\gamma\delta$ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 6147-6151.
- Kraehenbuhl JP, Neutra MR. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol Rev* 1992; 72: 853-879.
- Kroese, FGM. Immunology of the rat. In: Pastoret PP, Griebel P, Bazin H, Govaerts A, eds. *Handbook of vertebrate immunology*. San Diego: Academic Press, 1998: 137-198.

- Kuo S, El Guindy A, Panwala CM, Hagan PM, Camerini V. Differential appearance of T cell subsets in the large and small intestine of neonatal mice. *Pediatr Res* 2001; 49: 543-551.
- Laky K, Lefrançois L, von Freeden-Jeffry U, Murray R, Puddington L. The role of IL-7 in thymic and extrathymic development of TCR $\gamma\delta$ cells. *J Immunol* 1998; 161: 707-713.
- Lanzavechia A. Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 348-354.
- Lee E, Schiller LR, Fordtran JS. Quantification of colonic lamina propria cells by means of a morphometric point counting method. *Gastroenterology* 1988; 94: 409-418.
- Lefrançois L, Goodman T. In vivo modulation of cytolytic activity and Thy-1 expression in TCR $\gamma\delta$ + intraepithelial lymphocytes. *Science* 1989; 243: 1716-1718.
- Lefrançois L, Parker CM, Olson M, Muller W, Wasner N, Schon MP, Puddington L. The role of b7 integrins in CD8 T cells trafficking during an antiviral immune response. *J Exp Med* 1999; 189:1631-1638.
- Lefrançois L, Puddington L. Extrathymic intestinal T-cell development: virtual reality? *Immunol Today* 1995; 16: 16-21.
- Lefrançois L. Intraepithelial lymphocytes of the intestinal mucosa: curiouser and curiouser. *Semin Immunol* 1991; 3: 99-108.
- Lefrançois L. Phenotypic complexity of intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *J Immunol* 1991; 147: 1746-1751.
- Leishman AJ, Naidenko OV, Attinger A, Koning F, Lena CJ, Xiong Y, Chang H, Reinherz E, Kronenberg M, Cheroutre H. T cell responses modulated through interaction between CD8 $\alpha\alpha$ and the nonclassical MHC Class I molecule TL. *Science* 2001; 294: 1936-1939.
- Levelt CN, de Jong YP, Mizoguchi E, O'Farrelly C, Bhan AK, Tonegawa S, Terhorst C, Simpson SJ. High- and low-affinity single-peptide/MHC ligands have distinct effects on the development of mucosal CD8 $\alpha\alpha$ and CD8 $\alpha\beta$ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5628-5633.
- Lin T, Matsuzaki G, Yoshida H, Kobayashi N, Kenai H, Omoto K, Nomoto K. CD3-CD8+ intestinal intraepithelial lymphocytes (IEL) and the extrathymic development of IEL. *Eur J Immunol* 1994; 24: 1080-1087.
- Lundqvist C, Baranov V, Hammarström S, Athlin L, Hammarström ML. Intra-epithelial lymphocytes. Evidence for regional specialization and extrathymic T cell maturation in the human gut epithelium. *Int Immunol* 1995; 7: 1473-1487.
- Lundqvist C, Melgar S, Yeung M, Hammarstrom S, Hammarstrom M. Intraepithelial lymphocytes in human gut have lytic potential and a cytokine profile that suggest T helper I and cytotoxic functions. *J Immunol* 1996; 157: 1926-1934.
- Lyscom N, Brueton MJ. Intraepithelial, lamina propria and Peyer's patch lymphocytes of the rat small intestine: isolation and characterization in terms of immunoglobulin markers and receptors for monoclonal antibodies. *Immunology* 1982; 45: 775-783.
- Lyscom N, Brueton MJ. The development of intraepithelial and Peyer's patch lymphocytes subtypes in the small intestine of newborn rats. *Clin Exp Immunol* 1983; 54: 158-162.

- Ma A, Boone DL, Lodolce JP. The pleiotropic functions of interleukin 15: not so interleukin 2-like after all. *J Exp Med* 2000; 191: 753-755.
- Machado CSM, Rodrigues MAM, Maffei HVL. Gut intraepithelial lymphocyte counts in neonates, infants, and children. *Acta Paediatr* 1994; 83:1264-1267.
- Madara JL, Parkos C, Colgan S, Nusrat A, Atisook K, Kaoutzani P. The movement of solutes and cells across tight junctions. *Ann NY Acad Sci* 1992; 664: 47-60.
- Madara JL, Stafford J. Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest* 1989; 83: 724-727.
- Manzano M, Abadia-Molina AC, Garcia-Olivares E, Gil A, Rueda R. Absolute counts and distribution of lymphocyte subsets in small intestine of BALB/c mice during weaning. *J Nutr* 2002; 132: 2457-2762.
- Masopust D, Jiang J, Shen H, Lefrancois L. Direct analysis of the dynamics of the intestinal mucosa CD8 T cell response to systemic virus infection. *J Immunol* 2001; 166: 2348-2356.
- Masopust D, Vezyz V, Marzo A, Lefrancois L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* 2001; 291: 2413-2417.
- Mayer ED, Salomon P, Bauer W, Plous R, Piccinini L. Expression of Class II molecules on intestinal epithelial cells in humans: differences between normal and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1991; 100: 3-12.
- Mayer L, Panja A, Li Y. Antigen recognition in the gastrointestinal tract: death to dogma. *Immunol Res* 1991; 10: 356-359.
- Mayer L, Shlien R. Evidence for functional of Ia molecules on gut epithelial cells in man. *J Exp Med* 1987; 166: 1471-1483.
- Mayrhofer G, Brooks A. Lymphopoiesis in lymphocyte-filled villi in the small intestine of the rat. *Clin Immunol Immunopathol* 1995; 76, S55-S59.
- Mayrhofer G, Moghaddami M, Murphy C. Lymphocyte-filled villi (LFV): non-classical organized lymphoid tissues in the mucosa of the small intestine. *Mucosal Immunol* 1999; 7: 9-13.
- McCluggage SG, Low FN. Microdissection by ultrasonication: porosity of the intestinal epithelial basal lamina. *Am J Anat* 1984; 171: 207-216.
- Menezes JS, Mucida DS, Cara DC, Alvarez-Leite JI, Russo M, Vaz NM, Faria AMC. Stimulation by food proteins plays a critical role in the maturation of the immune system. *Int Immunol* 2003; 15: 447-455.
- Mestecky J. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretion. 1987; 7: 265-276.
- Moebius U, Kober G, Griscelli AL, Hercend T, Meuer SC. Expression of different CD8 isoforms on distinct human lymphocyte subpopulations. *Eur J Immunol* 1991; 21: 1793-1800.

- Moghaddami M, Cummins A, Mayrhofer G. Lymphocyte-filled-villi: comparison with other lymphoid aggregations in the mucosa of the human small intestine. *Gastroenterology* 1998; 115: 1588-1591.
- Moore TA, von Freeden-Jeffry U, Murray R, Zlotnik A. Inhibition of gamma delta T cells development and early thymocyte maturation in IL-7 $-/-$ mice. *J Immunol* 1996; 157: 2366-2373.
- Moreau MC, Raibaud P, Muller MC. Relationship between the development of the intestinal IgA immune system and the establishment of microbial flora in the digestive tract of young holstenic mice. *Ann Immunol* 1982; 133D: 29-34.
- Morrissey PJ, Charrier K, Horovitz DA, Fletcher FA, Watson JD. Analysis of the intra-epithelial lymphocyte compartment in SCID mice that received co-isogenic CD4 $^{+}$ T cells. Evidence that mature post-thymic CD4 $^{+}$ T cells can be induced to express CD8 alpha in vivo. *J Immunol* 1995; 154: 2678-2686.
- Mowat AM, Viney JL. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev* 1997; 156: 145-166.
- Mowat AM. Human intraepithelial lymphocytes. *Springer Semin Immunopathol* 1990; 12: 165-190.
- Nagler-Anderson C. Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa. *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 59-67.
- Nair PNR, Schroeder HE. Duct associated lymphoid tissue (DALT) of minor salivary glands and mucosal immunity. *Immunology* 1986; 57: 171-80.
- Nash S, Parkos C, Nusrat A, Delp C, Madara JL. In vitro model of intestinal crypt abscess: a novel neutrophil-derived secretagogue (NDS) activity. *J Clin Invest* 1991; 87: 1474-1477.
- Nash S, Stafford J, Madara JL. Effects of polymorphonuclear leukocyte transmigration on the barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest* 1987; 80: 1104-1113.
- Oida T, Suzuki K, Nanno M, Kanamori Y, Saito H, Kubota E, Kato S, Itoh M, Kaminogawa S, Ishikawa H. Role of gut cryptopatches in early extrathymic maturation of intestinal intraepithelial T cells. *J Immunol* 2000; 164: 3616-3626.
- Onai N, Kitabatake M, Zhang Y, Ishikawa H, Ishikawa S, Matsushima K. Pivotal role of CCL25 (TECK)-CCR9 in the formation of gut cryptopatches and consequent appearance of intestinal intraepithelial T lymphocytes. *Int Immunol* 2002; 14: 687-694.
- Owen RL, Nemanic P. Antigen processing structures of the mammalian intestinal tract: an SEM study of lymphoepithelial organs. *Scanning Electron Microsc* 1978; 2: 367-378.
- Page ST, Bogatzki LY, Hamerman JA, Sweenie CH, Hogarth PJ, Malissen M, Perlmutter RM, Pullen AM. Intestinal intraepithelial lymphocytes include precursors committed to the T cell receptor $\alpha\beta$ lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9459-9464.
- Pardoll DM, Fowlkes BJ, Bluestone JA, Kruisbeek A, Maloy WL, Coligan JE, Schwartz RH. Differential expression of two distinct T-cell receptors during thymocyte development. *Nature* 1987; 326: 79-81.
- Park EJ, Takahashi I, Ikeda J, Kawahara K, Okamoto T, Quejón MN, Fukuyama S, Groh V, Spies T, Obata Y, Miyazaki JI, Kiyono H. Clonal expansion of double-positive intraepithelial lymphocytes

- by MHC class I-related chain A expressed in mouse small intestinal epithelium. *J Immunol* 2003; 171: 4131-4139.
- Parkos CA, Delp C, Arnaout MA, Madara JL. Neutrophil migration across a cultured intestinal epithelium: dependence on a CD11b/CD18 mediated event and enhanced efficiency in physiological direction. *J Clin Invest* 1991; 88: 1605-1612.
 - Pegg AE, Hibasami H, Matsui J, Bethell DR. Formation and interconversion of putrescine and spermidine in mammalian cells. *Adv Enzyme Regul* 1981; 19: 427-451.
 - Pénit C, Lucas B, Vasseur F. Cell expansion and growth arrest phases during the transition from precursor (CD4-8-) to immature (CD4+CD8+) thymocytes in normal and genetically modified mice. *J Immunol* 1995; 154: 5103-5113.
 - Pennington DJ, Silva-Santos B, Shires J, Theodoridis E, Pollitt C, Wise EL, Tigelaar RE, Owen MJ, Hayday A. The inter-relatedness and interdependence of mouse T cell receptor $\gamma\delta$ + and $\alpha\beta$ + cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 991-999.
 - Perkkio M, Savilahti E. Time of appearance of immunoglobulin-containing cells in the mucosa of the neonatal intestine. *Pediatr Res* 1980; 14: 953-955.
 - Peters M, Secrist H, Anders KR, Nash GS, Rich SR, MacDermott RP. Normal human intestinal B lymphocytes. Increased activation compared with peripheral blood. *J Clin Invest* 1989; 83: 1827-1833.
 - Puddington L, Olson S, Lefrançois L. Interactions between stem cell factor and c-Kit are required for intestinal immune system homeostasis. *Immunity* 1994; 1: 733-745.
 - Reimann J, Rudolph A. Co-expression of CD8 α in CD4+ T cell receptor $\alpha\beta$ + T cells migrating into the murine small intestine epithelial layer. *Eur J Immunol* 1995; 5: 1580-1588.
 - Robey E, Fowlkes BJ. Selective events in T cell development. *Ann Rev Immunol* 1994; 12: 675-705.
 - Robey E, Fowlkes BJ. The $\alpha\beta$ versus $\gamma\delta$ T cell lineage choice. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 181-187.
 - Robijn RJ, Logtenberg T, Wiegman JJM, van Berge Henegouwen GP, Houwen RW, Koningsberger JC. Intestinal T lymphocytes. *Scand J Gastroenterol* 1995; 30: 23-33.
 - Rocha B, Vasalli P, Guy-Grand D. Thymic and extrathymic origins of gut intraepithelial lymphocyte populations in mice. *J Exp Med* 1998; 180: 681-686.
 - Rocha B, Vasalli P, Guy-Grand D. The V beta repertoire of mouse gut homodimeric alpha CD8+ intraepithelial T cell receptor alpha/beta+ lymphocytes reveals a major extrathymic pathway of T cell differentiation. *J Exp Med* 1991; 173: 483-486.
 - Rocha B, von Boehmer H, Guy-Grand D. Selection of intraepithelial lymphocytes with CD8a/a co-receptors by self-antigen in the murine gut. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 5336-5340.
 - Rothbard JB, Geftler ML. Interactions between immunogenic peptides and MHC proteins. *Ann Rev Immunol* 1991; 9: 527-565.

- Saito H, Kanamori Y, Takemori H, Nariuchi H, Kubota E, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T, Ishikawa H. Generation of intestinal T cells from progenitors residing in gut cryptopatches. *Science* 1998; 280: 275-278.
- Sarnacki S, Begue B, Jarry A, Cerf-Bensussan N. Human intestinal epithelial lymphocyte, a distinct population of activated T cells. *Immunol Res* 1991; 10: 302-305.
- Saurer L, Seibold I, Rihs S, Vallan C, Dumrese T, Mueller C. Virus-induced activation of self-specific TCR $\alpha\beta$ CD8 $\alpha\alpha$ intraepithelial lymphocytes does not abolish their self-tolerance in the intestine. *J Immunol* 2004; 172: 4176-4183.
- Savage DC. Characterization of the anaerobic flora in man and animals, in clinical and experimental gnotobiotics. In: Fliedner TN, Heit H, Neithammer D, Pflieger H, eds. New York: Gustav-Fischer Verlag, 1979: 163-168.
- Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Ann Rev Microbiol* 1977; 31: 107-133.
- Schieferdecker HL, Ullrich R, Hirseland H, Zeitz M. T cell differentiation antigens lymphocytes in the human intestinal lamina propria. *J Immunol* 1992; 149: 2816-2822.
- Schieferdecker HL, Ullrich R, Weiss-Breckwoldt AN, Stein H, Riecken EO, Zeits M. The HML-1 antigen of intestinal lymphocytes is an activation antigen. *J Immunol* 1990; 144: 2541-2549.
- Schultz RJ, Parkes A, Mizoguchi E, Bahan AK, Koyashu S. Development of CD4-CD8- alpha beta TCR+ NK1.1+ lymphocytes: thymic selection by self antigen. *J Immunol* 1996; 157: 4379-4389.
- Selby WS, Janossy G, Jewell DP. Immunohistological characterization of intraepithelial lymphocytes of the human gastrointestinal tract. *Gut* 1981; 22: 169-176.
- Shanahan F. The intestinal immune system. In: Johnson LR, ed. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, Vol. I. New York: Raven Press, 1994: 643-684.
- Shinkai Y, Rathburn G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F, Stall AM, Alt FW. RAG2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 1992; 68: 855-867.
- Simon TC, Cho A, Tso P, Gordon JI. Suppressor and activator functions mediated by a repeated heptad sequence in the liver fatty acid-binding protein gene (Fabpl). *J Biol Chem* 1997; 272: 10652-10663.
- Sinkora M, Sinkora J, Reháková Z, Splíchal I, Yang H, Parkhouse RME, Trebichavsky I. Prenatal ontogeny of lymphocyte subpopulations in pigs. *Immunology* 1998; 95: 595-603.
- Sminia T, van der Brugge-Gamelkoorn G, Jeurissen SHM. Structure and function of bronchus-associated lymphoid tissue (BALT). *Crit Rev Immunol* 1989; 9: 119-150.
- Smith A, Hayday A. An $\alpha\beta$ T cell independent immunoprotective response towards gut coccidian is supported by $\gamma\delta$ cells. *Immunology* 2000; 101: 325-332.
- Spencer J, Isaacson PG, Diss TL, MacDonald TT. Expression of disulphide-linked and non-disulphide linked forms of the gamma/delta T cell receptor in human small intestinal epithelium. *Eur J Immunol* 1989; 19: 1335-1338.

- Spencer J, MacDonald T, Finn T, Isaacson PG. The development of gut associated lymphoid tissue in the terminal ileum of fetal human intestine. *Clin Exp Immunol* 1986; 64: 536-543.
- Spencer J, MacDonald TT. Ontogeny of human mucosal immunity. In: MacDonald TT, ed. *Ontogeny of the Immune System of the Gut*. Boca Raton: CRC Press, 1990: 23-50.
- Steinman RN. The dendritic cell system and its role in immunogenecity. *Ann Rev Immunol* 1991; 88: 1605-1612.
- Suzuki H, Duncan GS, Takimoto H, Mak TW. Abnormal development of intestinal intraepithelial lymphocytes and peripheral natural killer cells in mice lacking the IL-2 receptor beta chain. *J Exp Med* 1997; 185: 499-505.
- Suzuki K, Oida T, Hamada H, Hitotsumatsu O, Watanabe M, Hibi T, Yamamoto H, Kubota E, Kaminogawa S, Ishikawa H. Gut cryptopatches: Direct evidence of extrathymic anatomical sites for intestinal T lymphopoiesis. *Immunity* 2000; 13: 691-702.
- Swain SL, Bradley LM, Croft M, Tonkonogy S, Atkins G, Weinberg AD, Duncan DD, Hedrick SM, Dutton RW, Huston G. Helper T-cell subsets: phenotype, function and the role of lymphokines in regulating their development. *Immunol Rev* 1991; 123: 115-144.
- Sydora B, Aranda R, Tangri S, Holcombe H, Camerini V, Castano R, Cardell S, Huse WD, Peterson PA, Cheroutre H, Kronenberg M. Lymphocyte-epithelial cell cross talk in the intestine: do nonclassical class I molecules have a big part in the dialogue? In: M Kagnoff, and H Kiyono, eds. *Mucosal Immunology*. New York: Academic Press, 1996: 205-222.
- Tagliabue A, Befus AD, Clark DA, Bienenstocks J. Characteristics of natural killer cells in the murine intestinal epithelium and lamina propria. *J Exp Med* 1982; 155: 1785-1796.
- Taguchi T, Dicher WK, Fujihashi K, Yamamoto M, Mc Ghee JR, Bluestone JA, Kiyono H. Novel function for intestinal intraepithelial lymphocytes: murine CD3+, $\gamma\delta$ TCR+ T cells produce IFN- γ and IL-5. *J Immunol* 1991; 147: 3736-3744.
- Takimoto H, Nakamura T, Takeuchi M, Sumi Y, Tanaka T, Nomoto K, Yoshikai Y. Age-associated increase in number of CD4+CD8+ intestinal intraepithelial lymphocytes in rats. *Eur J Immunol* 1992; 22: 159-164.
- Taunk J, Roberts AI, Ebert EC. Spontaneous cytotoxicity of human intraepithelial lymphocytes against epithelial tumors. *Gastroenterology* 1992; 102: 69-75.
- Teh HS, Kishi H, Scott B, von Boehmer H. Deletion of autospecific T cells in T cell receptor (TCR) transgenic mice spares cells with normal TCR levels and low levels of CD8 molecules. *J Exp Med* 1989; 169: 795-806.
- Teitelbaum DH, Reyes BS, Merion RM, Mosley RL. Intestinal intraepithelial lymphocytes: Identification of an inhibitory subpopulation. *Journal of surgical research* 1995; 63: 123-127.
- Ten B, Damink C, Joosten HMLJ, Huis V. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int J Food Microbiol* 1990; 3:73-84.
- Ter Steege JCA, Buurman WA, Forget P-P. The neonatal development of intraepithelial and lamina propria lymphocytes in the murine small intestine. *Dev Immunol* 1997; 5: 121-128.



- Terrence K, Pavlovitch CP, Matechak EO, Fowlkes BJ. Premature expression of T cell receptor (TCR) $\alpha\beta$ suppresses TCR $\gamma\delta$ gene rearrangements but permits development of $\gamma\delta$ lineage T cells. *J Exp Med* 2000; 192: 537-548.
- Thompson FM, Mayrhofer G, Cummins AG. Dependence of epithelial growth of the small intestine on T cell activation during weaning in the rat. *Gastroenterology* 1996; 111: 37-44.
- Tice DG. Ontogeny of natural Killer activity in rat small bowel. *Transplant Proc* 1990; 22: 2458-2459.
- Todd D, Singh AJ, Greiner DL, Mordes JP, Rossini AA, Bortell R. A new isolation method for rat intraepithelial lymphocytes. *J Immunol Methods* 1999; 224: 111-127.
- Todd DJ, Greiner DL, Rossini AA, Mordes JP, Bortell R. An atypical population of NK cells that spontaneously secrete IFN- γ and IL-4 is present in the intraepithelial lymphoid compartment of the rat. *J Immunol* 2001; 167: 3600-3609.
- Torres-Nagel N, Kraus E, Brown MH, Tiefenthaler G, Mitnacht R, Williams AF, Hünig T. Differential thymus dependence of rat CD8 isoform expression. *Eur J Immunol* 1992; 22: 2841-2848.
- Trejdosiewicz LK. Intestinal intraepithelial lymphocytes and lymphoepithelial interactions in the human gastrointestinal mucosa. *Immunol Lett* 1992; 32: 13-19.
- Tsujimura K, Obata Y, Matsudaira Y, Ozeki S, Yoshikawa K, Saga S, Takahashi T. The binding of thymus leukemia (TL) antigen tetramers to normal intestinal intraepithelial lymphocytes and thymocytes. *J Immunol* 2001; 167: 759-764.
- Unanue ER, Allen PM. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science* 1987; 236: 551-557.
- Vaage JT, Dissen E, Ager A, Roberts I, Fossum S, Rolstad B. T cell receptor-bearing cells among rat intestinal intraepithelial lymphocytes are mainly $\alpha/\beta+$ and are thymus dependent. *Eur J Immunol* 1990; 20: 1193-1196.
- Van der Heijden PJ, Bianchi AT, Heidt PJ, Stok W, Bokhout BA. Background (spontaneous) immunoglobulin production in the murine small intestine before and after weaning. *J Reprod Immunol* 1989; 15: 217-227.
- Van der Heijden PJ, Stok W, Bianchi TJ. Contribution of immunoglobulin-secreting cells in the murine small intestine to the background immunoglobulin production. *Immunology* 1987; 62: 551-555.
- Van Houten N, Mixer PF, Wolfe J, Budd RC. CD2 expression on murine intestinal intraepithelial lymphocytes is bimodal and defines proliferative capacity. *Int Immunol* 1993; 5: 665-672.
- Viney J, Kilshaw P, Mac Donald T. Cytotoxic $\alpha\beta+$ and $\gamma\delta+$ T cells in murine intestinal epithelium. *Eur J Immunol* 1990; 20: 1623-1626.
- Viney J, McDonald TT, Spencer J. Gamma/delta T cells in the gut epithelium. *Gut* 1990; 31: 841-844.
- Whiting CV, Bland PV. An immunoassay for the quantitation of cell membrane MHC class II antigen. *J Immunol Methods* 1990; 133: 169-174.

- Wilson AD, Bland PW, Stokes CR. Expression and distribution of Ia antigen in the murine small intestine: influence of environment and cholera toxin. *Int Arch Immunol* 1990; 91: 348-353.
- Wostmann B. Germ-free and gnotobiotic animals models. In: Melby E Jr, Atman N, eds. *Handbook of laboratory animal science*. Cleveland: CRC Press, 1996: 175-182.
- Yamada K, Kimura Y, Nishimura H, Namii Y, Murase M, Yoshikai Y. Characterization of CD4⁺CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ and CD4-CD8 $\alpha\alpha$ ⁺ intestinal intraepithelial lymphocytes in rats. *Int. Immunol.* 1999; 11: 21-28.
- Yang H, Parkhouse ME. Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues. *Immunology* 1996; 89: 76-83.
- Yewdell JW, Bennink JR. The binary logic of antigen processing and presentation to T cells. *Cell* 1990; 62: 203-206.
- Zeitz M, Schieferdecker HL, Ullrich R, Jahn HU, James SP, Riecken EO. Phenotype and function of lamina propria T lymphocytes. *J Immunol Res* 1991; 10: 199-206.