

Malaltia Celíaca i Citometria de Flux

1. Introducció

La **malaltia celíaca** (MC) és una intolerància permanent al gluten ocasionada per fenòmens autoimmunes que provoca una inflamació crònica de la mucosa duodenal a individus amb predisposició genètica (el 90% dels pacients presenta l'heterodímer HLA-DQ2 i el 10% restant sols presentar el HLA-DQ8).

Aquesta intolerància desencadena una atròfia de les vellositats que recobreixen el duodè impedit l'absorció dels nutrients de manera apropiada.

S'estima que la malaltia afecta al 1% de la població, però se sap que és una patologia considerablement subdiagnosticada per ser amb freqüència asimptomàtica o que en ocasions els símptomes es presenten de forma discontinua i amb un espectre clínic molt variable. Pot aparèixer a qualsevol etapa de la vida i, tot i que se sol diagnosticar a la infància, als països desenvolupats cada vegada es diagnostica més en adults.

Els criteris actuals de la ESPGHAN (Husby *et al.* 2012) recomanen el diagnòstic de la malaltia celíaca basat en la simptomatologia, la serologia positiva i la histologia de biòpsia intestinal, però cap d'aquestes proves confirma el diagnòstic per si sola.

Amb la finalitat de complementar i incrementar l'especificitat dels estudis citats, diverses publicacions recolzen també l'ús de la **citometria de flux** pel diagnòstic diferencial amb altres enteropaties que cursen també amb atròfia vellositària; en aquells casos on la biòpsia és dubtosa o falsament negativa per l'afectació discontinua de la mucosa i especialment, en els casos de refractarietat, ja que les repercussions clíniques que pot comportar aquesta forma agressiva són potencialment de transformació neoplàsica (Eiras *et al.* 1998; Olivencia *et al.* 2008; Roy, 2010; Melero *et al.* 2011; León 2011).

L'estudi per citometria es basa en la identificació immunofenotípica i la quantificació dels limfòcits intraepitelials (LIEs) de la mucosa duodenal.

Al limfograma intraepitelial característic de la MC trobem un augment de la població de LIEs totals CD45+, un increment de LIEs TcR $\gamma\delta$ + (>8.5%) i una disminució de la densitat de LIEs NK like (CD3-CD45+ <10%) amb la persistència de l'increment de CD3+ TcR $\gamma\delta$ + a la superfície del LIE i la

Catlab Informa

normalització, generalment, dels altres dos paràmetres després de la retirada del gluten de la dieta.

A la forma més agressiva i de pitjor pronòstic (sense resposta a la dieta estricta sense gluten), la malaltia celíaca refractària tipus II (MCR tipus II), apareix una població de LIEs aberrant que no expressen receptors de superfície de la cèl·lula T (CD3-, CD8- i TcR-) i que només conserven l'expressió de CD103+ com a marcador intraepitelial i l'expressió de CD3+ al citoplasma (citCD3+). A més aquesta població presenta un reordenament oligo o monoclonal del TcR (detectat molecularment per PCR).

Aquest fenotip atípic afecta a <5% de la població celíaca i predisposa a aquests malalts a desenvolupar entre altres processos neoplàsics, el limfoma T intestinal amb un 50% de supervivència als 5 anys del diagnòstic.

2. Limfòcits intraepitelials: Descripció i subpoblacions

El budell prim és un òrgan limfoide primari amb estructures limfoides organitzades (ex. les Plaques de Peyer). El teixit limfoide associat al tub digestiu té un alt contingut en limfòcits T convencionals, però a la làmina pròpia i a l'epiteli intestinal es troben també els limfòcits intraepitelials (LIEs) que són cèl·lules T que no es seleccionen en el timus, que es troben adherides a la superfície basolateral dels enteròcits i que formen una població separada dins del sistema limfoide de la mucosa.

Per les seves característiques fenotípiques i la seva distribució tissular es pensa que aquesta població és responsable de la defensa local del teixit enfront a infeccions i tumors, i de la regulació de la resposta ocasionada per altres cèl·lules.

Els LIEs estan formats majoritàriament (>50%) per limfòcits T que difereixen en el seu origen, funció i immunofenotip dels limfòcits T convencionals, però també hi ha una subpoblació de LIEs (<40%) amb fenotip similar a les cèl·lules NK (LIEs NK *like*).

Es poden distingir els següents subtipus normals de LIEs segons els seus receptors i correceptors:

- **LIEs TcR $\alpha\beta$ (CD4 $\alpha\beta$ + o CD8 $\alpha\beta$ +) convencionals:** Pateixen un procés de selecció tímica restringida per les molècules HLA clàssiques i migren des de la perifèria després de l'estímul antigènic. Formen part del sistema immunitari adaptatiu. Constitueixen la subpoblació majoritària dels LIEs de fenotip T (80-85%); d'aquests fins al 85% presenten un fenotip CD3+CD8+TcR $\alpha\beta$ + i menys del 10% són CD3+CD4+TcR $\alpha\beta$ +

Catlab Informa

- **LIEs TcR $\gamma\delta$** : Capaços de reconèixer molècules pròpies i altres antígens d'origen no peptídic. Pertanyen al sistema immunitari innat. Constitueixen una subpoblació minoritària dels LIEs de fenotip T (<8.5%) i són CD3+ amb expressió variable de CD8+ (40-80%).
- **LIEs TcR $\alpha\beta$ (dobles negatius o CD8 $\alpha\alpha$ +) no convencionals**: Pateixen un procés de selecció diferent durant la seva ontogènia, no restringit per molècules HLA clàssiques. Tenen una gran càrrega auto reactiva i una possible funció reguladora.
- **LIEs NK *like***: Presenten un fenotip similar a les cèl·lules NK (CD3-, CD7+, CD4-, CD8-, TcR-, CD16+ i CD56+); marcadors implicats en la toxicitat directa no associada al complex major d'histocompatibilitat. Representen més d'un 10% dels LIEs CD45+CD3-.

3. Identificació dels LIEs per citometria de flux

L'estudi dels LIEs es realitza en una mostra de biòpsia duodenal obtinguda en el curs d'una endoscòpia diagnòstica.

El processament de la mostra es basa en incubar la biòpsia en un medi de cultiu RPMI enriquit amb FCS (fetal calf serum) a on afegim EDTA i DTT per provocar el trencament de les unions intracel·lulars i l'alliberament dels LIEs i els enteròcits. La suspensió cel·lular resultant d'aquesta desepitelització es recull per centrifugació i s'incuba amb anticossos conjugats amb diferents fluorocroms pel seu anàlisi per citometria.

El panel d'anticossos dissenyat pel diagnòstic de la malaltia celíaca per citometria de flux pot ser més o menys extens, però s'han d'incloure com a mínim els següents marcadors: CD45, CD103, CD3 i TcR $\gamma\delta$.

Els LIEs totals s'identifiquen per la coexpressió de CD45 i CD103 amb baixa dispersió lateral SSC; la resta de marcadors s'utilitzaran per caracteritzar diferents subpoblacions de LIE

- **CD45**: Permet identificar la població limfoide de la resta de cel·lularitat alliberada pel procés de desepitelització.
- **CD103**: Permet seleccionar les cèl·lules intraepitelials de la població CD45+ anteriorment identificada.
- **CD3**: Permet identificar les subpoblacions de limfòcits CD3+ i limfòcits CD3- (LIEs NK *like*) en la població de LIEs.
- **TcR $\gamma\delta$** : Permet seleccionar la subpoblació de limfòcits T $\gamma\delta$ + en la població de LIEs CD3+.

Catlab Informa

A CatLab hem dissenyat un protocol de screening de 8 colors amb el citòmetre digital FacsCanto II on afegim altres anticossos com el CD7, el CD4, el CD8 i el CD3 citoplasmàtic per poder identificar correctament els LIEs convencionals, tenir un control del procés de desepitelització i detectar possibles expressions o manca d'expressions atípiques.

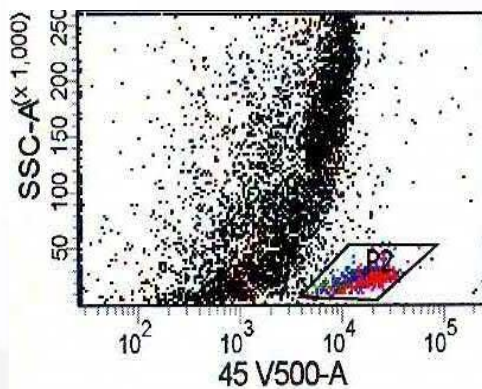
Hi processem i analitzem un total de 10.000 cèl·lules i la combinació d'anticossos i fluorocroms és la següent:

CD3 V450/CD103 FITC/CD4 PE/citCD3 PerCP-Cy5.5/TcR $\gamma\delta$ PE-Cy7/CD7 APC/CD8 APC-H7

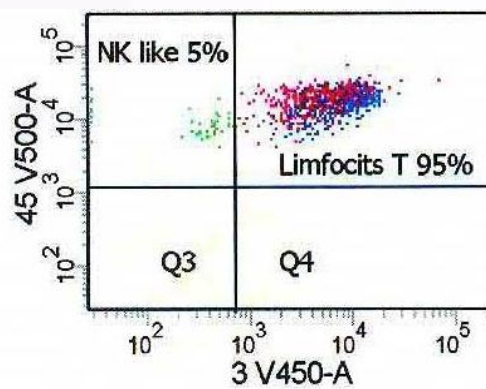
En el cas de detectar un patró fenotípic aberrant, ampliem l'estudi amb anticossos específics de diferents subpoblacions com el CD45RO, CD122, CD69, CD38, CD161, CD94, CD16, CD56 i TcR $\alpha\beta$.

Exemple d'imatges obtingudes d'un patró fenotípic celíac:

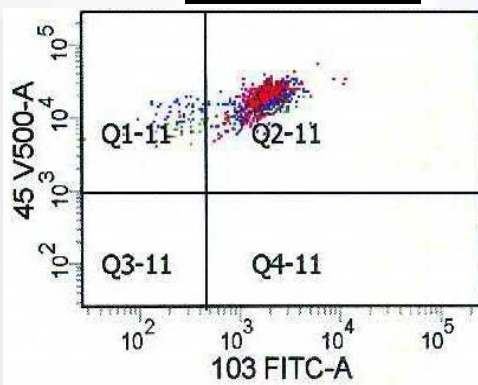
CD45 vs SSC



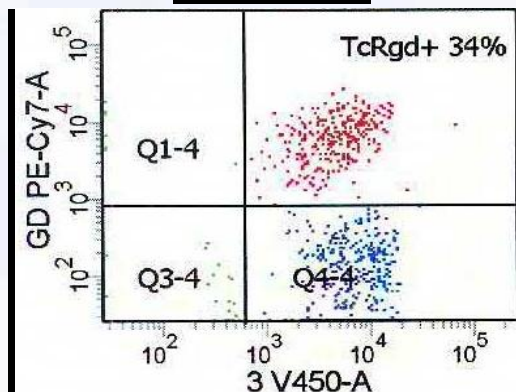
CD3 vs CD45



CD103 vs CD45



CD3 vs TcR $\gamma\delta$



Catlab Informa

4. Conclusió

En definitiva, l'estudi per citometria dels LIEs complementa l'estudi histològic clàssic aportant major especificitat. És particularment útil en el diagnòstic diferencial respecte altres enteropaties que cursen amb atròfia vellositària, útil en els casos on la biòpsia es dubtosa o falsament negativa per l'afectació a trossos de la mucosa, pot ajudar al pronòstic i seguiment de la malaltia celíaca i especialment, pot discriminar altres patologies greus com el limfoma de cèl·lules T associat a enteropatia.

5. Bibliografia

Vaquero Ayala L, Arias Rodríguez L, Vivas Alegre S. *Enfermedad celíaca refractaria. Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca*. Barcelona, España: OmniaScience; 2013. P. 361-375.

León F. *Flow cytometry of intestinal intraepithelial lymphocytes in celiac disease*. J. Immunol. Methods. 2011; 363: 177-186.

Melero J, García M, Vargas ML, Fernández JJ, Muñoz MI, González C, Doblaré E. *Utilidad del recuento e inmunofenotipaje de los linfocitos intraepiteliales de la mucosa intestinal en el diagnóstico de la enfermedad celíaca*. Rev. Lab. Clin. 2011; 4: 15-22.

Roy Ariño G. *Citometría de flujo diagnóstica*. Sociedad Española de Enfermedad Celíaca. 2010.

Olivencia P, Cano A, Martín MA, León F, Roy G, Redondo C. *Enfermedad celíaca del adulto y linfocitos intraepiteliales. ¿Nuevas opciones para el diagnóstico?* Gastroenterol. Hepatol. 2008; 31: 555-559.

Eiras P, Roldán E, Camarero C, Olivares F, Bootello A, Roy G. *Flow cytometry description of novel CD3-/CD7+ intraepithelial lymphocyte subset in human duodenal biopsies: potential diagnostic value in coeliac disease*. Cytometry 1998; 34: 95-102.

Judith Vidal

Responsable Citometria de flux

CATLAB

Tel. 93.748.56.00 - ext. 5041 / 616.26.48.91

jvidal@catlab.cat

www.catlab.cat