Gastroenterol Hepatol. 2018;41(Espec Congr 2):203

Gastroenterología y Hepatología

https://www.elsevier.es/gastroenterologia

P-79 - OPTIMIZACIÓN DEL AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LINFOCITOS B Y CÉLULAS PLASMÁTICAS EN LA MUCOSA INTESTINAL HUMANA

A.C. Marín[1,2,3], S. Fernández-Tomé[1,2,3], A. Díaz-Guerra[1,2,3], I. Mora-Gutiérrez[1,2,3], I. Becerro[1,2], V. Martín Domínguez[1,2], T. Álvarez Malé[1,2], J.A. Moreno-Monteagudo[1,2], C. Santander[1,2,3,4], M. Chaparro[1,2,3,4], J.P. Gisbert[1,2,3,4] y D. Bernardo[1,2,3]

[1]Servicio de Aparato Digestivo, Hospital Universitario de La Princesa, Madrid. [2]Instituto de Investigación Sanitaria Princesa, IIS-IP, Madrid. [3]Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, CIBEREHD, Madrid. [4]Universidad Autónoma de Madrid.

Resumen

Introducción: La inmunoglobulina A (IgA) es imprescindible para mantener los mecanismos de homeostasis intestinal y para regular a la microbiota. La IgA es producida por los linfocitos B (LB) y las células plasmáticas (CP) de la mucosa intestinal las cuáles, a su vez, son importantes en el desarrollo de diversos procesos intestinales, incluyendo la enfermedad inflamatoria intestinal. Si bien los diversos métodos de procesamiento de las biopsias intestinales para obtener células mononucleares de lámina propia (CMLP) han sido ampliamente estudiados en el contexto de otras células del sistema inmune, se desconoce sin embargo el protocolo óptimo para el estudio de los LB y CP de la mucosa humana.

Objetivos: Determinar el mejor método de procesamiento de las biopsias intestinales humanas para estudiar y caracterizar el fenotipo de las subpoblaciones de LB y CP intestinales.

Métodos: Se evaluaron los 2 métodos más empleados para la obtención de CMLP: la digestión por colagenasa y el protocolo walk-out. En ambos casos, las biopsias se lavaron con DTT/EDTA para eliminar las bacterias asociadas al tejido, así como la capa de mucus y las células epiteliales. Seguidamente las muestras fueron procesadas en paralelo, siendo la mitad de ellas digeridas con colagenasa/liberasa durante 2h (protocolo colagenasa), mientras que la otra mitad fueron cultivadas en medio de cultivo completo durante 18h (protocolo-walkout), recogiendo posteriormente las CMLP que habían migrado de la mucosa hacia el medio de cultivo. Dado que la colagenasa puede alterar la expresión de algunos marcadores extracelulares, se evaluó este aspecto en células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Las CMSP fueron obtenidas mediante centrifugación sobre gradiente de ficoll, tras lo cual una fracción fue directamente teñida y la otra fracción fue tratada con los protocolos de colagenasa o de walk-out. Tanto las CMLP como las CMSP fueron teñidas con anticuerpos (CD19, CD27, CD38, CD45, IgD, IgG, IgM) y caracterizadas por citometría.

Resultados: Las CMLP y CMSP fueron caracterizadas dentro de las células viables singletes. Los LB se identificaron como células $CD19^{+}$, y las CP como $CD27^{alto}CD38^{alto}$. En las CMSP se observó que la colagenasa disminuyó la expresión de CD19, CD27, CD38 e IgD, mientras que el cultivo de 18h sólo disminuyó significativamente la expresión de IgM. De igual forma, las CMLP tratadas con

colagenasa disminuyeron sus niveles de CD19 a la par que aumentaron los niveles de CD38 e IgG comparado con las CMLP procesadas con el protocolo walk-out.

Conclusiones: El aislamiento de las CMLP mediante la digestión con colagenasa altera significativamente la expresión de marcadores clave para el estudio de las poblaciones intestinales de LB y CP por citometría de flujo. Por tanto, la caracterización de las subpoblaciones de LB y CP presentes en la mucosa intestinal humana debería realizarse por abordajes alternativos, como es el protocolo walk-out.

© 2018 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados