

Introducción:

Los linfocitos intraepiteliales se encuentran en contacto estrecho con las células epiteliales y con los antígenos presentes en el luz intestinal. Estos linfocitos se han clasificado de acuerdo con la expresión diferencial de su receptor de antígenos de células T (TCR), en los que expresan el heterodímero $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$, así como también según el tipo de correceptor que expresan, es decir, si expresan CD4, el heterodímero CD8 α CD8 β o bien, el homodímero CD8 $\alpha\alpha$ ¹. Muchas de las funciones de estas células permanecen sin dilucidarse debido a la dificultad técnica de su aislamiento². A pesar de esto, se han estudiado algunas de sus funciones; por ejemplo, la defensa en contra de microorganismos patógenos como rotavirus³, T. gondii⁴ y Giardia lamblia⁵. Además, se ha demostrado que los linfocitos T CD4⁶, T CD8 α ^{7,8} y T $\gamma\delta$ ⁹ ejercen funciones reguladoras al producir citocinas supresoras como IL-10 y TGF- β . En este cartel se presenta un método eficaz que hemos adoptado en el laboratorio para aislar a estas células.

Disección del intestino

- 1.- Cortar el intestino 1 cm por debajo del estómago y tomar este extremo con una pinza para jalarlo de la cavidad abdominal. Con forme el intestino es extraído, este se disecciona del mesenterio con otra pinza. Detener la extracción y realizar un segundo corte aproximadamente 1 cm arriba del ciego.
- 2.- Insertar una jeringa de 50 mL llena con PBS frío a una sonda para "oral gavage" y posteriormente, colocar dicha sonda en el intestino por su abertura proximal para después infiltrarlo con PBS hasta extraer todo el contenido luminal.
- 3.- Opcionalmente se pueden extraer las placas de Peyer con unas tijeras curvas.
- 4.- Insertar nuevamente la sonda y usarla como guía mientras se corta longitudinalmente el intestino, o bien, usar una tijera con un extremo en forma de "botón" o de bola para realizar este paso.
- 5.- Doblar el intestino a la mitad y sostenerlo con una pinza por un extremo sobre un tubo falcon de 50 mL con 20 mL de medio RPMI. En esta posición, cortar de arriba abajo el intestino en segmentos de 0.5 cm, dejándolos caer sobre el tubo falcon.

Disección del intestino:¹⁰

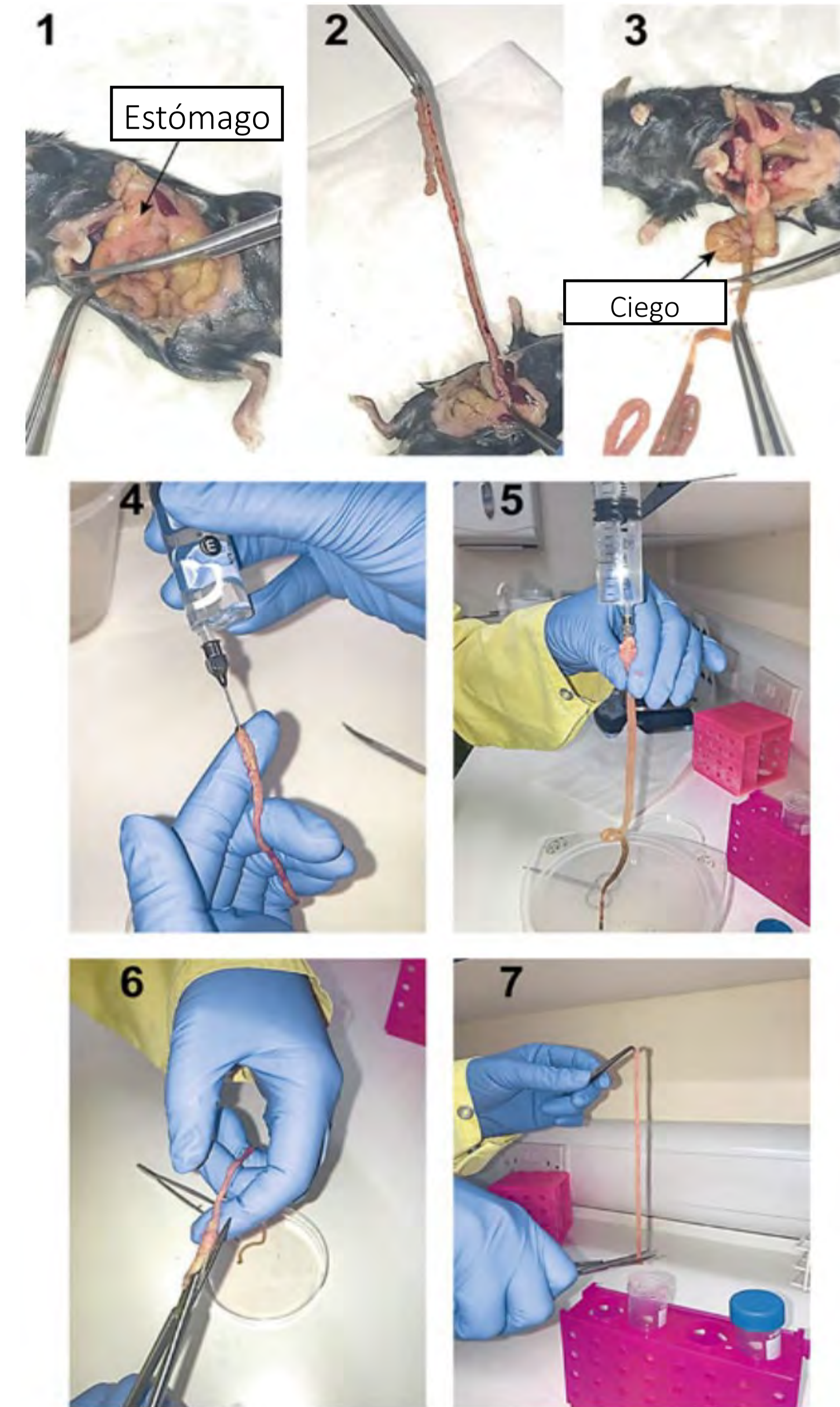


Imagen 1: Ubicación del intestino delgado en la cavidad abdominal del ratón (1), y su extracción (2) hasta 1 cm antes del ciego (3). Inserción de la sonda (4) para limpiar el intestino con PBS (5). Corte longitudinal (6) y transversal (7) del intestino delgado.

Gradiente de densidad formado por el Percoll:¹⁰

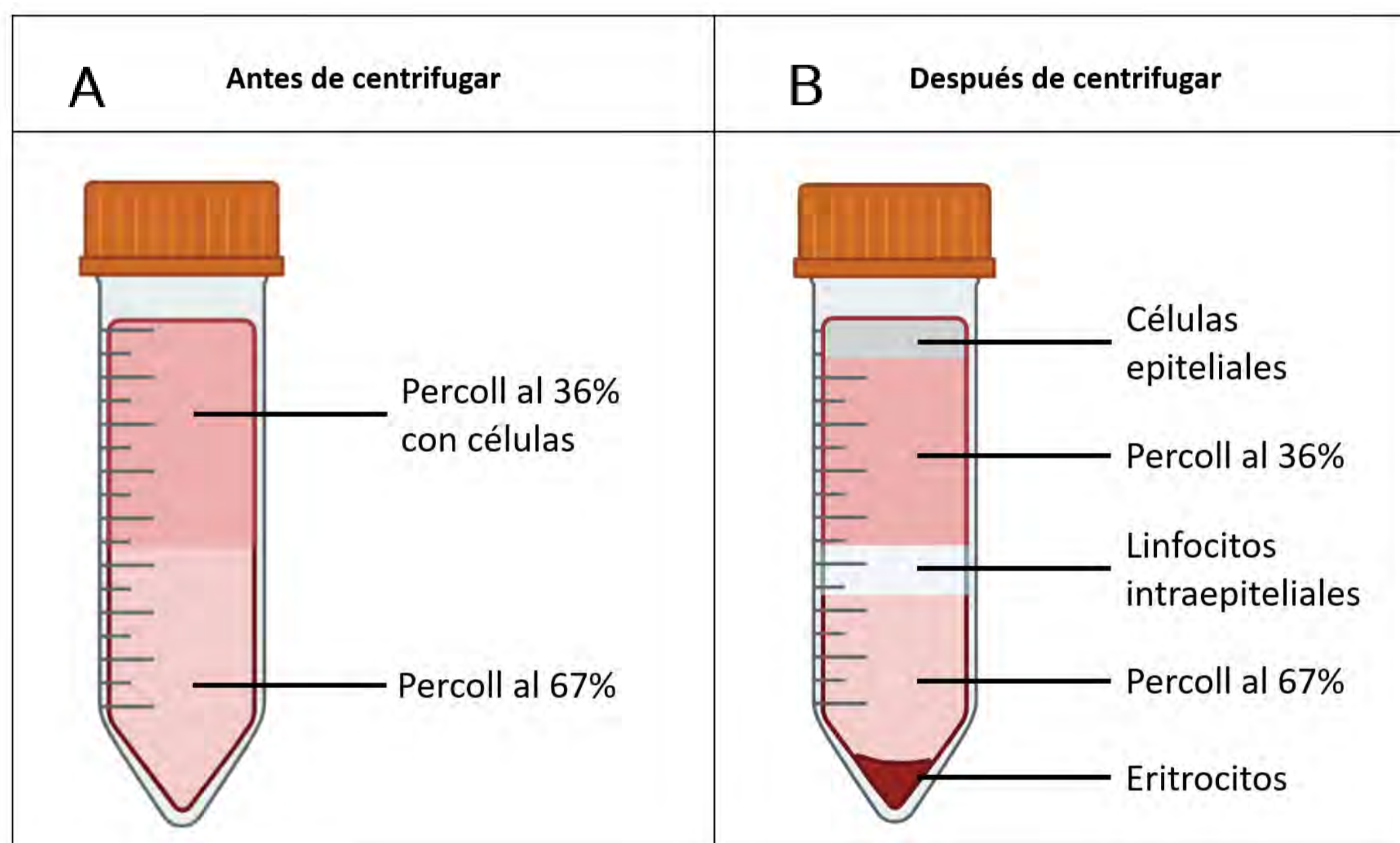


Imagen 2: Esquema del gradiente de densidad formado por el Percoll antes de centrifugar (A) y después (B).

Linfocitos T $\gamma\delta$ intraepiteliales y de ganglios linfáticos mesentéricos

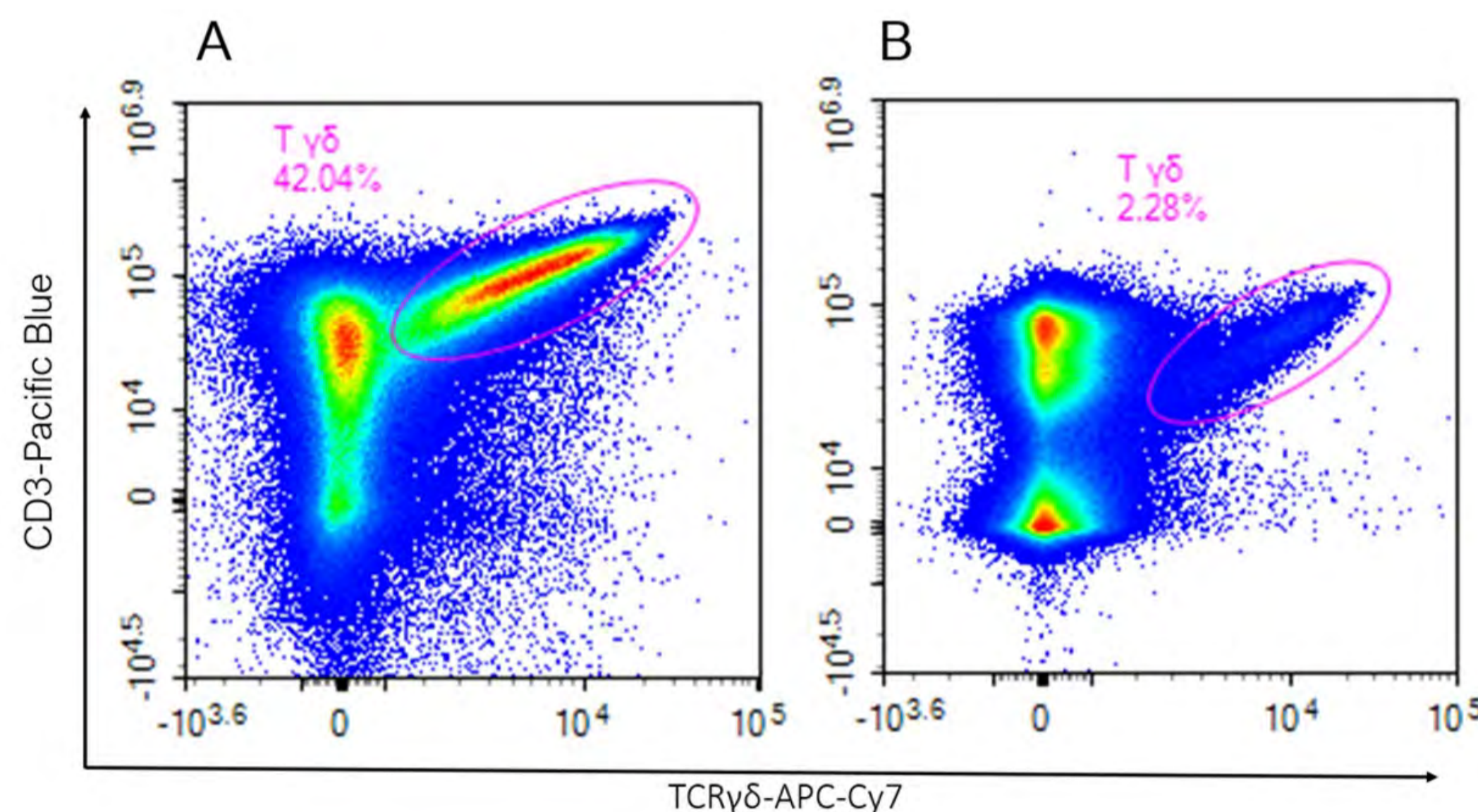


Imagen 3: Proporción de linfocitos T $\gamma\delta$ intraepiteliales (A) y de ganglios linfáticos mesentéricos (B) para mostrar su enriquecimiento intraepitelial.

Linfocitos Th17 intraepiteliales

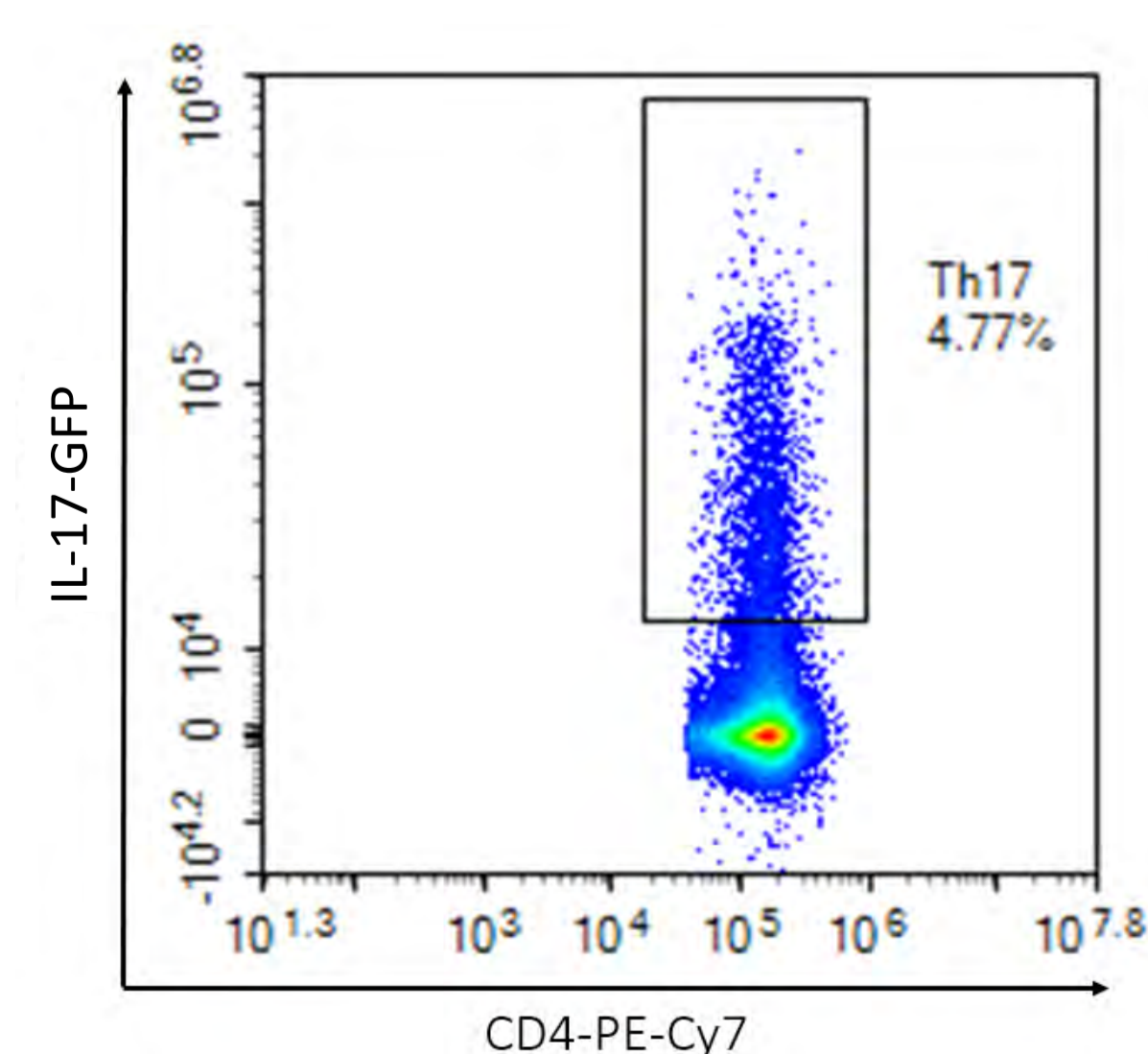


Imagen 4: Imagen representativa de citometría de flujo de linfocitos Th17 intraepiteliales con el reportero IL17-GFP sin estimulación.

Expresión de CD8 α en linfocitos T $\gamma\delta$ y T CD4 intraepiteliales:

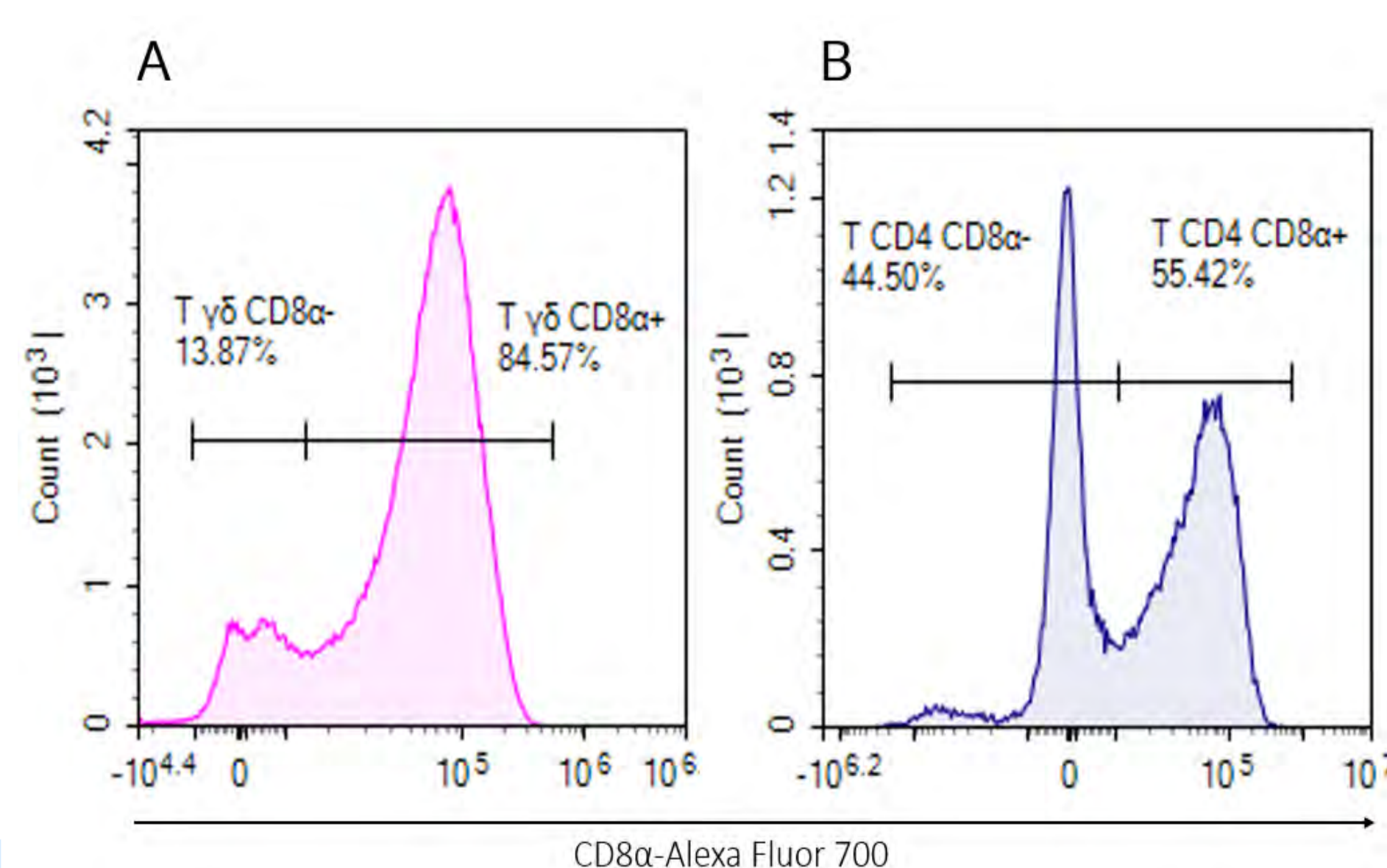


Imagen 5: Histogramas representativos que muestran la expresión de CD8 α en linfocitos T $\gamma\delta$ (A) y T CD4 (B) intraepiteliales.

Aislamiento de linfocitos intraepiteliales usando un gradiente de Percoll

- 1.- Agregar DTT al medio con los intestinos a una concentración de 1 mM e incubarlos durante 40 minutos a 200 rpm a temperatura ambiente.
- 2.- Centrifugar durante 5 minutos a 500 x g a temperatura ambiente y aspirar el sobrenadante para después resuspender los segmentos de intestino en 10 mL de medio nuevo.
- 3.- Vortex por 3 minutos a una velocidad de 7 y pasar este volumen a un nuevo tubo falcon de 50 mL a través de un "cell strainer" de 100 μ m.
- 4.- Poner los segmentos de intestino de regreso dentro del tubo falcon y agregar 10 mL de medio nuevo.
- 5.- Repetir los pasos 6 y 7.
- 6.- Usar 30 mL de medio para lavar el "cell strainer", llevando el volumen del tubo a 50 mL y centrifugar durante 5 minutos a 500 x g a temperatura ambiente.
- 7.- Aspirar el sobrenadante y resuspender el botón celular en 8 mL de Percoll al 36%.
- 8.- Tomar dos tubos falcon de 15 mL y agregar a cada uno 4 mL de de Percoll al 67%.
- 9.- Agregar 4 mL de la mezcla del Percoll al 36% con las células a cada tubo falcon con el Percoll al 67% y centrifugar durante 30 minutos a 700 x g sin freno a temperatura ambiente.
- 10.- Luego de centrifugar, los linfocitos intraepiteliales aparecen en una interfase que se forma entre el Percoll al 36% y el del 67%.
- 17.- Aspirar la fase superior correspondiente a células epiteliales y, posteriormente, con una micropipeta de 1000 μ L aspirar el anillo que se forma entre las dos fases de Percoll.
- 18.- Colocar este volumen en un tubo falcon nuevo de 15 mL, agrega medio hasta llenarlo y centrifugarlo durante 5 minutos a 700 x g.
- 19.- Finalmente, se realiza un segundo lavado con suero fetal bovino (SFB) al 2% para realizar una tinción para citometría de flujo o bien, se realiza con medio RPMI para cultivar las células.

Conclusión:

Las funciones de los linfocitos intraepiteliales no se han dilucidado por completo. Una razón de esto es por la dificultad de aislar una población representativa de su función al mismo tiempo en que se mantiene la viabilidad de estas células. Sin embargo, actualmente se cuentan con protocolos que permiten su obtención de forma sencilla. En este trabajo se presenta un protocolo que se ha adoptado en el laboratorio por ser práctico y eficaz. Dentro de los puntos importantes a considerar para una extracción exitosa son: 1) Extraer el intestino lo más pronto posible luego de sacrificar el ratón. 2) Mantener el intestino en PBS frío hasta que se procese. 3) Usar medio con SFB en una concentración del 5 al 10% en la incubación de 40 minutos con DTT.

Financiamiento: FORDECYT 303046

Referencias bibliográficas: 1. Cheroutin, H., Lambolez, F. & Mucida, D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nature Reviews Immunology* vol. 11 445–456 (2011). 2. Ye, Y., Yue, M., Jin, X., Chen, S. & Li, Y. Isolation of murine small intestinal intraepithelial $\gamma\delta$ T Cells. *Immunological Investigations* 39, 661–673 (2010). 3. Dharakul, T. et al. Immunization with Baculovirus-Expressed Recombinant Rotavirus Proteins VP1, VP4, VP6, and VP7 Induces CD8 α T Lymphocytes That Mediate Clearance of Chronic Rotavirus Infection in SCID Mice. vol. 65 (1991). 4. Kasper, L. H., LePage, A. C., Buzoni-Gatel, D. & Bout, D. T. Toxoplasma gondii Induce Long Term Immunity Against Gut-Derived Intraepithelial Lymphocytes. *J Immunol* References <http://www.jimmunol.org/content/161/9/4902>1998;161:4902-4908; <http://www.jimmunol.org/content/161/9/4902.fullref-list-1> (2022). 5. Kanwar, S. S., Ganguly, N. K., Walla, N. S. & Mahajan, R. C. Direct and antibody dependent cell mediated cytotoxicity against Giardia lamblia by splenic and intestinal lymphoid cells in mice. *Gut* vol. 27 (1986). 6. Sujino, T. et al. Tissue adaptation of regulatory and intraepithelial CD4 $^{+}$ T cells controls gut inflammation. *Science* 352, 1581–1586 (2016). 7. Denning, T. L. et al. Mouse TCR β + CD8 α Intraepithelial Lymphocytes Express Genes That Down-Regulate Their Antigen Reactivity and Suppress Immune Responses. *The Journal of Immunology* 178, 4230–4239 (2007). 8. Poussier, P., Ning, T., Banerjee, D. & Julius, M. A unique subset of self-specific intraintestinal T cells maintains gut integrity. *Journal of Experimental Medicine* 195, 1491–1497 (2002). 9. Rezendes, R. M. et al. $\gamma\delta$ T Cell-Secreted XCL1 Mediates AnticD3-Induced Oral Tolerance. *The Journal of Immunology* 203, 2621–2629 (2019). 10. James, O. J., Vandereyken, M. & Swamy, M. Isolation, Characterization, and Culture of Intestinal Intraepithelial Lymphocytes. in *Methods in Molecular Biology* vol. 2121 141–152 (Humana Press Inc., 2020).