



**CÉLULAS INMUNES EN SANGRE Y EXPRESIÓN  
DE IMMUNE CHECKPOINTS EN  
ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHÓLICA Y SU  
ASOCIACIÓN CON LA ENFERMEDAD  
INFLAMATORIA INTESTINAL**

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA**

**Universidad de Cantabria y Universidad del País Vasco**

Junio 2019

**PATRICIA LAMADRID PEROJO**

Director: Marcos López Hoyos

## ***AGRADECIMIENTOS***

---

A mi director Marcos López Hoyos, por sus ánimos, dedicación, apoyo y consejos, pero sobre todo, por motivarme tanto para que diera lo mejor de mí en este trabajo desde un comienzo y regalarme la oportunidad de pertenecer a un grupo de laboratorio tan agradable y acogedor.

A Mayte Arias, por aceptar la realización de este proyecto y trabajar con tanta rapidez y eficacia facilitando tanto el trabajo.

A David San Segundo por su amabilidad y ayuda con los controles de este estudio, así como su apoyo en el resto del proyecto.

A María, por hacerme un hueco tanto en su mesa de laboratorio como en su apretado horario, ayudarme todo lo que ha estado en su mano y no perder la paciencia con mis incansables preguntas (que han sido muchas). No podía haber tenido una mejor compañera de mesa.

A David, por hacerme una gran entendida en citometría de flujo, porque para tener el nivel “experto” todavía me faltan muchas compensaciones y análisis. Gracias por ayudarme con todas las dudas e implicarte tanto.

A mis queridas MJ y Sandra, gracias por “mirarme y evaluarme” todos los días, entrenarme tan bien dentro y fuera de la campana, y hacer que fuera con una sonrisa cada día al laboratorio. Un millón de puntos para vosotras.

A María, Gabi, Begoña y todo el personal del IDIVAL que ha hecho que me sintiera como en casa.

A Sandra, María y todos los profesionales del laboratorio de inmunología y del Servicio de Digestivo del Hospital de Marqués de Valdecilla que han hecho posible, directa o indirectamente, este proyecto.

A mis padres, por enseñarme a entregarme de la mejor manera con aquello que requiere esfuerzo y dedicación.

A mi hermano y Ángela, por su apoyo incondicional desde el corazón.

A Álvaro y Maitane, por su cariñosa y desinteresada ayuda siempre que lo he necesitado.

A todos los no mencionados y no intencionadamente olvidados. Gracias a todos por hacerlo posible.

## ABREVIATURAS

---

- APC:** “Antigen Presenting Cell” (Célula presentadora de antígeno)
- BTLA:** “B- and T-lymphocyte attenuator” (Atenuador de los linfocitos B y T)
- CM:** Célula T de Memoria Central
- CTLA-4:** “Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4” (Antígeno 4 del linfocito T citotóxico)
- DAMP:** “Danger-Associated Molecular Patterns” (Patrones moleculares asociados a peligro)
- DM2:** Diabetes Mellitus Tipo II
- EM:** Célula T de Memoria Efectora
- GM-CSF:** “Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor” (Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos)
- IBD:** Inflammatory Bowel Disease (Enfermedad inflamatoria intestinal o **EII**)
- IC:** Intervalo de confianza
- ICOS-L:** “ICOS Ligand” (Ligando de ICOS, una proteína codificada en humanos por el gen *ICOSLG*)
- ICP:** “Immune CheckPoints” (Puntos de control de la respuesta inmunitaria)
- IFN- $\gamma$ :** Interferón  $\gamma$
- IL-17:** Interleucina 17
- IL-2:** Interleucina 2
- ILC:** “Innate Lymphoid Cells” (Células linfoides innatas)
- IMIDs:** “Immune-mediated inflammatory disorders” (Enfermedades inflamatorias inmunomediadas)
- LAG3:** “Lymphocyte-activation gene 3” (Gen de activación linfocitaria 3)
- Lin-:** Linaje negativo (Falta de expresión de CD3, CD19, CD14 y CD56)
- M/e/PMN MDSCs:** “Monocytic/early-stage/Polymorphonuclear Myeloid-derived suppressor cells” (Células mieloides supresoras monocíticas/en fase temprana/polimorfonucleares)
- MHC:** “Major Histocompatibility Complex” (Complejo mayor de histocompatibilidad)
- MZ-B:** “Marginal zone B” (Células B de la Zona Marginal)
- NAFLD:** “Non-Alcoholic Fatty Liver Disease” (Esteatohepatitis no alcohólica por depósito de grasa)
- NASH:** “Non-alcoholic Steatohepatitis” (Esteatohepatitis no alcohólica).
- PAMP:** “Pathogen-Associated Molecular Patterns” (Patrones moleculares asociados a patógenos)
- PBMCs:** Peripheral Blood Mononuclear Cells (Células mononucleares de sangre periférica)
- PBS:** “Phosphate Buffered Saline” (Buffer Fosfato Salino)

- PD-1:** “Programmed Cell Death Protein 1” (Proteína de muerte celular programada 1)
- PD-L1/2:** “Programmed Cell Death Protein Ligand-1/2” (Ligando 1/2 de la proteína de muerte celular programada 1)
- PHA:** “Phytohaemagglutinin” (Fitohemagglutinina)
- PMA:** Forbol miristato acetato
- PRR:** “Pattern Recognition Receptor” (Receptor de reconocimiento de patrones)
- SHP2:** “Non-Receptor Protein Tyrosine Phosphatase” (Proteína no receptora tirosina fosfatasa)
- TCR:** “T Cell Receptor” (Receptor de células T)
- TEMRA:** Célula T Efectora de Memoria RA
- Th:** T *helper* (Células T colaboradoras)
- TNF- $\alpha$ :** “Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ” (Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ )
- Tregs:** Células T reguladoras

## RESUMEN

---

La **esteatohepatitis no alcohólica por depósito de grasa (NAFLD)** es una patología que concurre en ciertas enfermedades inmunomediadas como la **enfermedad inflamatoria intestinal (EII)**. Su forma más agresiva se conoce como **NASH (esteatohepatitis no alcohólica)**. En ambas, se atribuye un mecanismo patogénico inflamatorio mediado por citocinas inflamatorias como TNF-alfa y poblaciones linfocitarias como Th1 y Th17. No obstante, los estudios al respecto son muy escasos y con una visión parcial. En el presente trabajo se ha planteado la realización de un estudio completo del número de poblaciones de la respuesta inmunitaria, tanto innata como adaptativa, circulantes en sangre. La hipótesis de trabajo sugiere que una regulación diferenciada de la respuesta inmunitaria puede ser responsable de la evolución hacia un NAFLD en pacientes con EII. El objetivo es encontrar un perfil celular diferencial entre los pacientes con EII que no evoluciona hacia NAFLD o NASH y los que sí. Se han estudiado 9 pacientes con NASH+EII, 9 con EII y 10 con NASH como grupo control. Además, se han incluido 149 sujetos controles sanos del Banco de Sangre y Tejidos de Cantabria. En ellos se han medido distintas poblaciones celulares de respuesta inmunitaria: linfocitos T efectoras, de memoria, naïve, células T reguladoras (Treg) y subtipos de células T *helper*; linfocitos B durante sus distintos estadios madurativos, células mieloides supresoras (MDSCs) y células linfoides innatas (ILC); así como el nivel de expresión de varios *immune checkpoints*. Varias subpoblaciones de la respuesta inmunitaria han resultado significativamente diferentes entre grupos, como las células Treg y Th17, y los subtipos 1 y 2 de las ILC. No se han encontrado diferencias importantes en la expresión de *immune checkpoints* basales y tras tres días de estimulación. En este trabajo ha sido posible establecer el protocolo para medir ILC en sangre periférica, cuyos niveles podrían ser de valor en cuanto a la distinción de EII respecto a EII con progresión hacia NAFLD, paralelamente a lo que se ha sugerido en el tejido hepático.

## ABSTRACT

---

**The Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)** is a disorder which occurs in certain immune-mediated diseases such as **Inflammatory Bowel Disease (IBD)**. Its most aggressive form is known as **NASH (Non-alcoholic Steatohepatitis)**. In both disorders, an inflammatory pathogenic mechanism mediated by inflammatory cytokines, such as TNF-alfa and lymphocyte populations like Th1 and Th17 is attributed. However, research regarding this issue are certainly scarce and biased. In the current project a complete study of the number of cell populations of the immune response both innate and adaptive is carried out. The work hypothesis suggests that a differentiated response may be responsible for the evolution towards NAFLD in patients with IBD. The aim is to find a differential cellular profile between patients with IBD who do not evolve towards NAFLD or NASH and those who do. Nine patients with NASH+IBD, nine with IBD and ten with NASH, as a disease control group, have been analyzed. In addition, 149 control subjects from the Blood and Tissue Bank of Cantabria have been included. In all of them, some different populations of the immune response have been measured: effector T cells, memory, naive, regulatory T cells (Treg) and *helper* T cell subtypes; B lymphocytes during their different maturational stages, suppressive myeloid cells (MDSCs) and innate lymphoid cells (ILC); as well as the expression level of several *immune checkpoints*. Several peripheral blood subsets of the immune response were found to be significantly different between groups, such as Treg and Th17 cells, and subtypes 1 and 2 of the ILC. No important differences in the expression of *immune checkpoints* molecules basal and after three days of stimulation were found. In this work it has been possible to set up the protocol to measure ILC in peripheral blood whose measurements are likely to be of value in distinguishing IBD from IBD progression to NAFLD, in parallel with what is suggested in liver tissue.

# ÍNDICE

---

1. Introducción.....	11
1.1 Proceso inflamatorio, IMIDS, NAFLD Y NASH.....	11
1.2 <i>Immune checkpoints</i> y su papel en la respuesta inmunitaria .....	13
2. Hipótesis y objetivos.....	17
3. Material y métodos .....	18
3.1 Anticuerpos monoclonales empleados en los estudios de citometría de flujo .....	18
3.2 Materiales .....	19
3.3 Reactivos .....	19
3.4 Instrumentación .....	20
3.5 Material biológico necesario.....	20
3.6 Métodos.....	20
4. Resultados .....	25
4.1 Puesta a punto de los paneles de citometría de flujo en sangre .....	25
4.2 Valores de referencia de la población normal .....	33
4.3 Resultados estadísticos de las poblaciones analizadas.....	35
4.3.1 Linfocitos T .....	35
4.3.2 Linfocitos B durante sus distintos estadios de diferenciación periférica desde célula B inmadura.....	40
4.3.3 MDSCs .....	42
4.3.4 ILC.....	43
4.3.5 Expresión de <i>immune checkpoints</i> .....	45
5. Discusión.....	48
6. Conclusiones.....	52
Referencias .....	53
Anexo .....	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Degeneración hepática desde NAFLD hasta cirrosis pasando por NASH . Relación con las IMIDs .....	12
<b>Figura 2.</b> Mecanismos moleculares de CTLA-4 y PD-1 de la atenuación de la activación de células T. Interacciones moleculares y señalización .....	15
<b>Figura 3.</b> Análisis por citometría de flujo de las poblaciones efectoras, memoria y virgen de linfocitos T .....	25
<b>Figura 4.</b> Análisis por citometría de flujo de las células T reguladoras (Treg) .....	26
<b>Figura 5.</b> Análisis por citometría de flujo de las células T <i>helper</i> .....	27
<b>Figura 6.</b> Detección por citometría de flujo de citocinas intracitoplasmáticas en subpoblaciones de células T <i>helper</i> .....	28
<b>Figura 7.</b> Análisis por citometría de flujo de linfocitos B durante sus distintos estadios de diferenciación periférica desde célula B inmadura .....	29
<b>Figura 8.</b> Análisis por citometría de flujo de las células mieloides supresoras (MDSCs).....	30
<b>Figura 9.</b> Análisis por citometría de flujo de expresión de <i>immune checkpoints</i> en el día 0 y a los 3 días tras estimulación con PHA.....	31
<b>Figura 10.</b> Análisis por citometría de flujo de las células linfoides innatas en sangre periférica .....	32
<b>Figura 11.</b> <i>Box plots</i> comparando tres grupos de pacientes con las poblaciones analizadas en el panel de citometría de las poblaciones efectoras, memoria y virgen de linfocitos T .....	36
<b>Figura 12.</b> <i>Box plots</i> comparando tres grupos de pacientes con las poblaciones analizadas en el panel de citometría de las células T reguladoras positivas para FoxP3 .....	37
<b>Figura 13.</b> <i>Box plots</i> comparando tres grupos de pacientes con las poblaciones analizadas en el panel de citometría de las subpoblaciones de células T <i>helper</i> (Th1, Th2 y Th17).....	38
<b>Figura 14.</b> <i>Box plots</i> comparando tres grupos de pacientes con las poblaciones analizadas en el panel de citometría de citocinas intracitoplasmáticas en subpoblaciones de células T <i>helper</i> .....	39
<b>Figura 15.</b> <i>Box plots</i> comparando tres grupos de pacientes con las poblaciones analizadas en el panel de citometría de los distintos estadios de maduración de linfocitos B desde célula B inmadura.....	41
<b>Figura 16.</b> <i>Box plots</i> comparando tres grupos de pacientes con las poblaciones analizadas en el panel de citometría de las células mieloides supresoras (MDSCs).....	42

**Figura 17.** *Box plots* comparando tres grupos de pacientes con las poblaciones analizadas en el panel de citometría de las células linfoides innatas (ILC).....44

**Figura 18.** *Box plots* comparando tres grupos de pacientes con las poblaciones analizadas en el panel de citometría de expresión de *immune checkpoints* en el día 0 .....46

**Figura 19.** *Box plots* comparando tres grupos de pacientes con las poblaciones analizadas en el panel de citometría de expresión de *immune checkpoints* en el día 3 .....47

**Figura 20.** Balance de los hallazgos encontrados en cada uno de los perfiles celulares inmunitarios de los tres grupos de pacientes .....50

## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1.</b> Anticuerpos monoclonales empleados en la técnica citometría de flujo. ....	19
<b>Tabla 2.</b> Características clínicas y demográficas de los 28 pacientes y los 149 controles reclutados .....	21
<b>Tabla 3.</b> Valores de referencia de los controles sanos de todas las poblaciones celulares analizadas en el estudio. ....	34
<b>Tabla 4.</b> Media y desviación estándar (DS) de los porcentajes de células/mm <sup>3</sup> de varios <i>immune checkpoints</i> en el día 0, día 3, variación entre ambos días y significación estadística.....	45
<b>Tabla 5.</b> Linfocitos T efectores, memoria y naïve (Figura 11) .....	56
<b>Tabla 6.</b> Células T reguladoras FoxP3+ (Figura 12).....	57
<b>Tabla 7.</b> Células T <i>helper</i> (Figura 13).....	57
<b>Tabla 8.</b> Citocinas intracitoplasmáticas de las subpoblaciones de T <i>helper</i> (Figura 14).....	58
<b>Tabla 9.</b> Linfocitos B (Figura 15) .....	59
<b>Tabla 10.</b> Células mieloides supresoras (MDSCs) (Figura 16) .....	60
<b>Tabla 11.</b> Células linfoides innatas (ILC) (Figura 17) .....	60
<b>Tabla 12.</b> <i>Immune checkpoints</i> (Figuras 18 y 19) .....	61

## 1. INTRODUCCIÓN

---

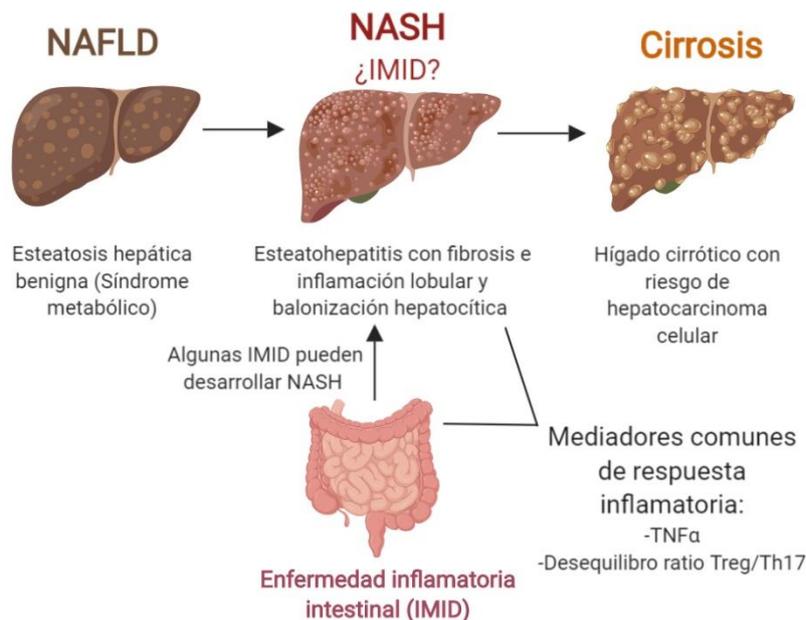
### 1.1 PROCESO INFLAMATORIO, IMIDs, NAFLD Y NASH

Las **enfermedades inflamatorias inmunomediadas (IMIDs)** son un grupo de enfermedades provocadas por una respuesta inmune inadecuada que desemboca en una inflamación crónica sistémica con la consiguiente alteración de la producción de citocinas, y comprenden desórdenes en principio tan distintos como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), la hidradenitis supurativa, la psoriasis o la espondilitis, entre otros. Las IMIDs tienen una prevalencia creciente del 5-7% en la población desarrollada. Además, este grupo de enfermedades tiene una respuesta terapéutica común a la hora de bloquear citocinas desreguladas del proceso inflamatorio (1,2). Por otro lado, una co-ocurrencia de las IMIDs, en gran medida de la EII, es la **esteatohepatitis no alcohólica por depósito de grasa (NAFLD)** (3).

La NAFLD es un espectro de estados de enfermedad caracterizada en un inicio por esteatosis hepática mayormente benigna y relacionada en gran medida con el síndrome metabólico, principalmente con la obesidad y la resistencia a la insulina (RI). Esta condición puede continuar su progresión hasta un estado más avanzado de la enfermedad, denominado **esteatohepatitis no alcohólica (NASH)**, definido por inflamación lobular y balonización hepatocítica, y la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa, es uno de los principales desencadenantes de esta progresión. Es de gran importancia distinguir el NASH de otras patologías hepáticas menos severas debido a que conlleva una progresión rápida hacia un deterioro hepático más grave. Además, engloba diversas alteraciones inflamatorias que pueden derivar en cirrosis e incluso en hepatocarcinoma. El NAFLD es la manifestación hepática del síndrome metabólico, cuyo mayor factor de riesgo es la obesidad, una patología que predispone al desarrollo de Diabetes Mellitus Tipo II (DM2), daños cardiovasculares y malignidad, características que pueden predecir una posterior fibrosis o NASH (4).

No obstante, aunque la mayor parte de los casos de NAFLD presenten factores de riesgo metabólicos clásicos, se ha descrito una posible relación con **factores independientes** que asocian esta patología a las IMIDs. Adicionalmente, se ha demostrado que la mayoría de pacientes con NAFLD coexistente con una EII no tenían asociado un síndrome metabólico, lo cual sugiere que el NAFLD en estos pacientes podría desarrollarse como consecuencia de una **carga inflamatoria independiente** de los factores metabólicos clásicos (5). Por otro lado, la patogenia del NASH es compleja y no del todo conocida por el momento. De hecho, sólo un

pequeño grupo de pacientes con NAFLD, expuestos a riesgos metabólicos similares, llegan a desarrollar NASH, e incluso, existen ocasiones en las que la inflamación precede a la esteatosis. Este hecho es clave a la hora de considerar la posibilidad de que el NASH y la NAFLD se desarrollen por causas fisiopatológicas distintas, y así considerar al **NASH como una entidad aparte** (6). Esto ha llevado a la hipótesis de que la combinación del NASH con las IMIDs puede dar lugar a dos fenotipos distintos de enfermedad: uno **metabólico** asociado estrechamente a los factores clásicos, y otro en el que predomina principalmente un ambiente **inflamatorio** no asociado a factores metabólicos de riesgo cardiovascular.



**Figura 1.** Degeneración hepática desde NAFLD (Esteatohepatitis no alcohólica por depósito de grasa) hasta cirrosis pasando por NASH (Esteatohepatitis no alcohólica). Relación de NASH con las IMIDs y mecanismos patogénicos comunes.

Una disfunción del tejido adiposo provocada por la hipertrofia del mismo conlleva una secreción de citocinas alterada así como un aumento de la liberación de ácidos grasos libres, esto provoca un estrés oxidativo y mitocondrial con un ambiente lipotóxico que desemboca en daño hepatocelular. Este daño puede desarrollar fibrosis e incluso hepatocarcinoma mediante la liberación de diversas citocinas, adipocinas y células inmunitarias, tanto innatas como adaptativas, que propician una relación entre el hígado, el tejido adiposo y el intestino, donde este último mediado por la microbiota, e interaccionando principalmente con el sistema inmune innato, contribuye al daño hepático. Estas características parecen ser las principales responsables de la respuesta inflamatoria hepática que culmina en el desarrollo del NASH y en sus posteriores agravantes (4, 7).

En referencia a los mecanismos patogénicos, se han encontrado gran cantidad de similitudes entre el NASH y las IMIDs, lo que sugiere que podrían compartir los mediadores que desencadenan ambas respuestas inflamatorias. El **factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ )** es la principal citocina implicada en este tipo de respuestas, y es por ello que los fármacos anti TNF $\alpha$  ejercen cierta protección tanto en NAFLD como en las IMIDs (8). Otro mecanismo especialmente similar entre el NASH y particularmente la EII, se debe a diversas células T, como las células T reguladoras (Tregs) y los subtipos Th1 y Th17, que tienen un rol decisivo en el proceso de inflamación hepática y el de otros órganos diana. El **desequilibrio del ratio Treg/Th17** a favor de las Th17, desencadena un aumento de la producción de citocinas inflamatorias, entre ellas TNF $\alpha$  o IL-6 (9).

También, las IMIDs en las que aumenta la permeabilidad intestinal y que tienen asociada una gran inflamación, desarrollan una esteatosis hepática donde aumenta aún más la permeabilidad en el intestino, ocasionando una inflamación hepática y a distancia. Esta permeabilidad intestinal asociada a algunas IMIDs es también una característica común en NAFLD (10).

Por estos factores, en algunas formas de NAFLD, el NASH se podría considerar una IMID porque comparte todas sus características.

## 1.2 IMMUNE CHECKPOINTS Y SU PAPEL EN LA RESPUESTA INMUNITARIA

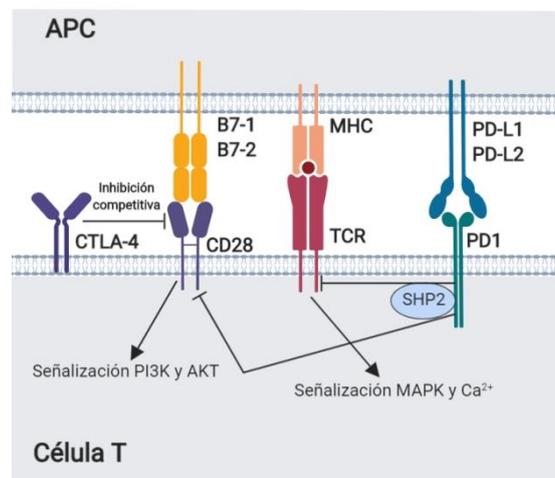
Los **puntos de control de la respuesta inmune o “immune checkpoints” (ICP)** evitan los fenómenos autoinmunes manteniendo la tolerancia inmunológica y su inhibición es un esperanzador abordaje del tratamiento antitumoral (11, 12). Por ello, se han desarrollado diversos anticuerpos contra estos *immune checkpoints*, para que con su bloqueo se induzca el rechazo al tumor estimulando la activación de linfocitos T, tanto los encargados de reconocer y destruir las células tumorales (CD8), como los que organizan la respuesta inmune (CD4). Estos últimos, además de contribuir a la activación de linfocitos T CD8, también juegan un gran papel en la producción de anticuerpos mediante la activación de linfocitos B (13).

La respuesta inmunitaria es la que dirige todo tipo de respuesta inflamatoria en patologías humanas infecciosas, autoinmunes, alérgicas o tumorales. En cada tipo de proceso, la respuesta se dirige hacia una rama u otra de un sistema inmune muy complejo y, además, la respuesta es plástica y varía durante las distintas fases de la enfermedad. La respuesta inmunitaria se compone principalmente de dos señales. En la **primera señal**, la célula presentadora de antígeno (APC) reconoce el patrón molecular asociado al antígeno o a peligro (PAMP o DAMP,

respectivamente) del patógeno gracias a su receptor de reconocimiento de patrones (PRR), presente en este tipo de células fagocíticas. Esto produce que la APC se active, produzca citocinas e interiorice al patógeno para eliminarlo, y adicionalmente, que el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de la membrana de esta célula presente un péptido de ese patógeno. Por consiguiente, el antígeno es presentado por el MHC a células de la respuesta adaptativa, concretamente a los linfocitos T, que lo reconocen gracias a su receptor (TCR) y son activados. Sin embargo, es necesaria una **segunda señal** para completar el proceso. Esta segunda señal se caracteriza por su capacidad de coestimulación, y la función de la APC es expresar unas moléculas coestimuladoras llamadas B7-1 (CD80) o B7-2 (CD86) que, en el caso de que quieran coestimular la respuesta de linfocitos T, se unirán a otra molécula de estas células denominada CD28, o por el contrario, en el supuesto de que quieran inhibir la respuesta T, se unirán al antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) (4). La respuesta inmunitaria se encuentra regulada por un balance entre señales coestimuladoras y coinhibitorias (14).

**CTLA-4** es una molécula coinhibidora que compete, con muchísima más afinidad, con CD28 por su unión a B7-1 o B7-2. Se expresa en linfocitos T activados y constitutivamente en células T reguladoras (Treg), mientras que en linfocitos T naïve se localiza en el interior celular y sale a la membrana cuando el TCR del linfocito T reconoce al antígeno presentado por el MHC. Una vez que esta molécula se estabiliza uniéndose a sus ligandos B7 en la APC, se va acumulando y atenúa la coestimulación positiva por CD28 limitando a su vez su señalización mediada principalmente por PI3K y AKT (15).

El papel principal de CTLA-4 es la regulación de la activación de células T en la respuesta inmunitaria, por lo que la coestimulación negativa que desencadena es crítica para mantener una tolerancia inmunológica y que no se desarrollen fenómenos autoinmunes. Adicionalmente, al expresarse constitutivamente en las células T reguladoras, esta molécula también es necesaria para mantener la tolerancia: la pérdida específica de CTLA-4 en estas células induce una activación aberrante de linfocitos T. Por todos los motivos mencionados, CTLA-4 funciona como un punto de control de la respuesta inmune o *immune checkpoint*, y su bloqueo se utiliza en inmunoterapia antitumoral para aumentar la actividad efectora de linfocitos T y disminuir los efectos inmunosupresores por las células T reguladoras (15).



**Figura 2.** Mecanismos moleculares de CTLA-4 y PD-1 de la atenuación de la activación de células T. Interacciones moleculares y señalización mediada por la unión de estos *immune checkpoints* con sus respectivos ligandos (B7-1 o B7-2: PD-I.1 o PD-I.2).

Otra molécula coinhibidora que actúa como *immune checkpoint* y tiene un papel importante en mantener la tolerancia, es la proteína de la muerte celular programada 1 o *programmed cell death-1 (PD-1)*, un receptor de superficie transmembrana que se expresa en linfocitos T y B activados y en células NK. Esta proteína ejerce su función inhibitoria al unirse a uno de sus dos ligandos: PD-L1, expresado en células inmunes, epiteliales, endoteliales y sobre todo tumorales; o PD-L2, presente mayormente en APCs. Este último ligando está inducido por la citocina IL-4 y por el factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), mientras que PD-L1 se induce por citocinas inflamatorias como IFN- $\gamma$ . La unión de PD-1 con PD-L1 antagoniza de manera directa la señalización por TCR reclutando a la tirosina fosfatasa SHP2, la cual desfosforila a la proteína quinasa Zap-70, inactivando finalmente a la célula T y disminuyendo la proliferación de linfocitos T, las citocinas y la actividad citotóxica (14, 15).

Por otro lado, estudios recientes demuestran que SHP2 muestra más preferencia por CD28 que por el TCR, por lo que tanto PD-1 como CTLA-4, en cierta manera, tienen mecanismos de acción similares a la hora de inhibir la coestimulación por CD28 (15).

Los *immune checkpoints* difieren mucho en su comportamiento si comparamos su acción en el ambiente tumoral y en las IMIDs. En el tumor, los *immune checkpoints* aumentan su actividad, lo que conlleva una disminución de la respuesta inmunitaria; en cambio, disminuyen sus niveles en las IMIDs, produciendo un aumento de la respuesta al estimular la acción de linfocitos T.

Tal como se ha descrito al inicio de la introducción, se ha sugerido la posibilidad de que el NASH sea una entidad independiente de NAFLD por sus muchas similitudes con las IMIDs. De hecho, algunas IMIDs, como la EII, pueden desembocar, por medio de una carga inflamatoria por factores no metabólicos y una respuesta inmunitaria exacerbada, en el NASH.

Actualmente contamos con herramientas para caracterizar las diferentes poblaciones celulares efectoras y reguladoras de la respuesta inmunitaria. Aunque la matriz biológica ideal para identificar las células inmunitarias implicadas en la patogenia de las IMIDs es el tejido, este es sin lugar a dudas un procedimiento invasivo que se intenta sustituir por métodos menos invasivos como la sangre periférica. Además, tal como se ha introducido, tanto las EII como NAFLD y el NASH son enfermedades sistémicas y es posible que la sangre sea un buen sistema donde estudiar cambios sistémicos en estas enfermedades. Mediante el estudio de la sangre y un amplio abanico de poblaciones celulares, se puede llegar a caracterizar distintos perfiles inmunitarios propios de las tres entidades relacionadas pero distintas, que permitirán definir perfiles de riesgo de evolución de la enfermedad. Esta aproximación puede permitir relacionar el NASH con factores independientes de los metabólicos clásicos y considerarlo como una patología aparte con rutas inflamatorias comunes a las IMIDs.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

La esteatohepatitis no alcohólica (NASH) es una enfermedad inflamatoria del hígado con un claro componente de riesgo metabólico, pero una respuesta inmunitaria exacerbada puede ser causa independiente de su producción. Es posible que la coexistencia de otras enfermedades inmunomediadas, como la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII), juegue un papel en el desencadenamiento del NASH con independencia de los factores metabólicos. El estudio de las distintas poblaciones celulares, tanto efectoras como reguladoras, en sangre de la respuesta inmune puede ayudar a diferenciar la EII del NASH y del NASH coexistente con EII, así como a definir marcadores celulares de utilidad clínica.

Los objetivos principales de este estudio son:

- La **puesta a punto de la técnica** de citometría de flujo para diversas poblaciones celulares de respuesta inmunitaria: linfocitos T efectores, de memoria, naïve, células T reguladoras (Treg) y subtipos de células T *helper*; linfocitos B durante sus distintos estadios madurativos, células mieloides supresoras (MDSCs) y células linfoides innatas (ILC); así como para medir el nivel de expresión de varios *immune checkpoints*.
- La **monitorización** de esas poblaciones en sangre de tres grupos de pacientes con enfermedades inmunomediadas: NASH, NASH coexistente con EII, y EII.
- La **búsqueda de patrones** de poblaciones celulares de la respuesta inmunitaria en sangre específicos de cada enfermedad y que puedan explicar posibles mecanismos patogénicos relacionados.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 ANTICUERPOS MONOCLONALES EMPLEADOS EN LOS ESTUDIOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO

		Anticuerpo	Fluorocromo	Clon	Isotipo	Casa Comercial	Referencia
		488nm	FITC	CD27	FITC	M-T271	Mouse BALB/c IgG1, κ
CD62L	FITC			DREG56	IgG1 Mouse	Beckman Coulter	IM1231U
CD3	FITC			UCHT1	IgG1 Mouse	Beckman Coulter	A07746
CD14	FITC			RMO52	IgG2a Mouse	Beckman Coulter	B36297
CD19	FITC			4G7	Mouse BALB/c IgG1, κ	BD	345776
CD56	FITC			HCD56	Mouse IgG1, κ	Biologend	318304
LAG-3	FITC			11C3C65	Mouse IgG1, κ	Biologend	369308
CD183 (CXCR3)	FITC			G025H7	Mouse IgG1, κ	Biologend	353704
IL-17a	FITC			BL168	Mouse IgG1, κ	Biologend	512308
PE	CD24		PE	ML5	Mouse IgG2a, κ	BD	555428
	CD45RO		PE	UCHL-1	Mouse BALB/c IgG2a, κ	BD	347967
	CD124		PE	G077F6	Mouse IgG2a, κ	Biologend	355004
	CD25		PE	B1.49.9	IgG2a Mouse	Beckman Coulter	A07774
	IFN-G		PE	25723.11	Mouse BALB/c IgG2b, κ	BD	340452
	CD117		PE	104D2	Mouse IgG1, κ	Biologend	313204
	CXCR5		PE	J252D4	Mouse IgG1, κ	Biologend	356904
	ICOSL		PE	2D3	Mouse IgG2b, κ	Biologend	309404
ECD	CD14		ECD	RMO52	IgG2a Mouse	Beckman Coulter	IM2707U
	CTLA-4		ECD (PE/Dazzle)	L3D10	Mouse IgG1, κ	Biologend	349922
PC5.5	CD19		PC5.5	J3-119	IgG1 Mouse	Beckman Coulter	B49211
	CD4		PC5.5	13B8.2	IgG1 Mouse	Beckman Coulter	A07752
	CD45		PC5.5	J33	IgG1 Mouse	Beckman Coulter	A62835
	CD8		PerCP	SK1	RPA-T8	BD	560662
	7-AAD		7AAD (PerCP)			TONBO	13-6993-T200
	BTLA		PerCP-Cy5.5	MIH26	Mouse IgG2a, κ	Biologend	344514
PC7	CD38		PE-Cy7	HIT2	Mouse IgG1, κ	Biologend	303515
	CD196 (CCR6)		PE-Cy7	G034E3	Mouse IgG2b, κ	Biologend	353418
	CD127		PC7	R34.34	IgG1 Mouse	Beckman Coulter	A64618
	CD11b	PE-Cy7	BEAR1	IgG1 Mouse	Beckman Coulter	A54822	
	CD3	PE-Cy7	SK7	Mouse BALB/c IgG1, κ	BD	557851	
638nm	APC	CD5	APC	UCHT2	Mouse IgG1, κ	Biologend	300611
		CD19	APC	J4.119	Mouse IgG1, κ	Beckman Coulter	IM2470
		CD336 (NKp44)	APC	P44-8	Mouse IgG1, κ	Biologend	325110
		CD25	APC	B1.49.9	IgG2a Mouse	Beckman Coulter	B09684
		CD33	APC	D3HL60.251	IgG1 Mouse	Beckman Coulter	IM2471
		IL-2	APC	5344.111	Mouse BALB/c IgG1, κ	BD	341116

		Anticuerpo	Fluorocromo	Clon	Isotipo	Casa Comercial	Referencia	
APC-700		PD-1	Alexa Fluor 700	EH12.2H7	Mouse IgG1, κ	Biologend	329952	
	APC-750	CD10	APC-Cy7	HI10a	Mouse IgG1, κ	Biologend	312212	
		CD294	APC-Cy7	BM16	Rat IgG2a, κ	Biologend	350114	
		CD4	APC-Vio770	VIT4	Mouse IgG2a	Miltenyi	130-096-652	
405nm	PB	CD16	APC-Cy7	3G8	Mouse IgG1, κ	Biologend	302018	
		CD21	VioBlue	HB5	Mouse IgG2a	Miltenyi	130-101-715	
		FOXP3	Pacific Blue	206D	Mouse IgG1, κ	Biologend	320116	
		CD3	CF Blue	UCHT-1	IgG1, kappa	Immunostep	3CFB2-100T	
		CD15	CF Blue	MCS-1	IgG3	Immunostep	15CFB-100T	
	KO	PD-L1	Brilliant Violet 421	29E.2A3	Mouse IgG2b, κ	Biologend	329714	
		CD20	VioGreen	LT20	Mouse IgG1	Miltenyi	130-096-904	
		CD45	KO	J.33	IgG1 kappa, Mouse	Beckman Coulter	B36294	
			HLA-DR	Brilliant Violet 510	L243	Mouse IgG2a, κ	Biologend	307646

**Tabla 1.** Anticuerpos monoclonales empleados en la técnica citometría de flujo. Se incluye: el fluorocromo y su longitud de onda ( $\lambda$ ) de emisión, el clon y su isotipo, la casa comercial y el número de referencia correspondiente. A la izquierda se muestra el tipo de fluorocromo asociado y el canal de fluorescencia donde se detectan.

### 3.2 MATERIALES

- Pipetas (Thermo Scientific) 100-1000 $\mu$ L, 20-200 $\mu$ L, 5-50 $\mu$ L, 0,5-10 $\mu$ L.
- Puntas pipetas con filtro (Gen3, Axygen) y sin filtro (Neptune y Sarstedt).
- Pipetas Pasteur estériles.
- Tubos de citometría (Sarstedt).
- Tubos estériles 5mL para citocinas (Falcon).
- Tubos Falcon 15mL estériles (Falcon).
- Tubos 50mL estériles (VWR).
- Microtubos 0,5 mL y microtubos 1,5 mL (Deltalab).

### 3.3 REACTIVOS

- Medio de cultivo R10: penicilina-estreptavidina (Lonza) (0,5%), aminoácidos no esenciales (Lonza) (1%), piruvato sódico (Lonza) (1%), L-glutamina (Lonza) (2%), FBS (PAA) (10%), medio RPMI-1640 (Sigma) (85,5%).
- Ficoll (Histopaque).
- Solución de lavado: Tampón fosfato salino (PBS).

- Anti-Human Foxp3 Staining Set APC (Invitrogen by Thermo Fisher, eBioscience): concentrado de fijación/permeabilización 4X (REF 00-5123-43), diluyente de fijación/permeabilización (REF 00-5223-56), buffer de permeabilización 10X (REF 00-8333-56).
- Solución de permeabilización 2 (BD).
- Albumin bovine Fraction V, pH 7.0 (BSA) (SERVA).
- Soluciones de estimulación (Sigma):
  - Fitohemaglutinina (PHA) [1 mg/ml].
  - Forbol miristato acetato (PMA) [10 µg/µL].
  - Brefeldin A [5mg/mL].
  - Ionomicina [10 µg/µL].

### 3.4 INSTRUMENTACIÓN

- Citómetro de flujo Cytoflex (Beckmann Coulter).
- Ordenador.
- Estufa de incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> (modelo 3404) (Thermo Scientific).
- Campana de flujo laminar (Telstar).
- Centrífuga 5810R (Eppendorf).

### 3.5 MATERIAL BIOLÓGICO NECESARIO

- Dos tubos de sangre periférica del paciente anticoagulada con heparina sódica.
- Un tubo de sangre periférica del control sano (DS) anticoagulada con heparina sódica.

### 3.6 MÉTODOS

#### *Población de estudio*

Ciento setenta y siete participantes se han reclutado para el estudio (45 mujeres y 132 hombres). Los integrantes del estudio pertenecían a dos grupos distintos: controles sanos (n=149) y pacientes con patologías hepáticas inflamatorias (n=28). El grupo de pacientes se divide a su vez, en tres subgrupos diferentes: **10** individuos con **NASH**, **9** con **NASH + EII** y **9** con **EII**. El grupo control fue reclutado del Banco de Sangre del hospital universitario Marqués de Valdecilla (Santander, España). El grupo de pacientes fue

reclutado por el Servicio de Digestivo del Hospital universitario Marqués de Valdecilla. Todos los voluntarios que han participado en este estudio firmaron un consentimiento informado. El estudio se enmarca dentro del **proyecto FIS PI18/01304**. En la siguiente tabla (**Tabla 2**) se muestran las características tanto clínicas como demográficas de los 177 sujetos estudiados.

Valores clínicos y demográficos de pacientes	NASH (n=10)	NASH+EII (n=9)	EII (n=9)	Controles (n=149)	p-valor NASH vs NASH+EII	p-valor NASH vs EII	p-valor NASH+EII vs EII
<b>%MUJERES</b>	30	33,33	55,56	22,82	1,000	0,3698	0,6372
<b>EDAD</b>	53 ± 10,41	57,07 ± 12,3	49,4 ± 12,31	46 ± 12	0,2858	0,4841	0,1883 (NS)
<b>Fosfatasa alcalina (FA)</b>	NR	98,78 ± 26,02	65,56 ± 17,72	NR	NA	NA	<b>0,0043</b>
<b>Transaminasa GPT (ALT)</b>	NR	36,89 ± 23,51	15,78 ± 9,93	NR	NA	NA	<b>0,0009</b>
<b>Proteína Reactiva C (PCR)</b>	NR	0,64 ± 0,34	0,47 ± 0,89	NR	NA	NA	<b>0,0368</b>
<b>IgG</b>	NR	1308,11 ± 343,97	1173,33 ± 133,7	NR	NA	NA	0,4283 (NS)
<b>IgA</b>	NR	315,78 ± 168,4	247 ± 105,81	NR	NA	NA	0,293 (NS)
<b>IgM</b>	NR	154,29 ± 78,93	144,01 ± 109,16	NR	NA	NA	0,4799 (NS)
<b>Diabetes (SI/NO)</b>	5/5	2/7	1/8	NR	0,3498	0,1409	1,000
<b>Tipo EII (C.ulcerosa/E.Crohn)</b>	NR	0/9	3/6	NR	NA	NA	0,2059
<b>I.Q (Cirugía) (SI/NO)</b>	NR	4/5	2/7	NR	NA	NA	0,6199

NA, no aplicable

NR, no realizado

NS, no significativo

**Tabla 2.** Características clínicas y demográficas de los 28 pacientes y los 149 controles reclutados para este estudio. Se muestra el porcentaje de mujeres, la edad, los niveles de fosfatasa alcalina (FA), transaminasa GPT (ALT), proteína reactiva C (PCR), inmunoglobulina G (IgG), A (IgA) y M (IgM), la presencia o ausencia de diabetes y procedimientos quirúrgicos, así como el tipo de enfermedad inflamatoria intestinal (EII). También se muestran los valores de *p* comparando los tres grupos de pacientes (NASH, NASH+EII Y EII).

#### *Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica*

Se han aislado células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) anticoagulada con heparina por centrifugación en gradientes de Ficoll a una temperatura de 21°C y 1500 revoluciones por minuto durante 15 minutos. Las PBMCs se han lavado con PBS estéril.

#### *Fenotipado inmunológico y análisis por citometría de flujo*

Las PBMCs se han resuspendido en 1100 µL de PBS estéril para dividir la muestra entre las 9 poblaciones celulares distintas a estudiar. El fenotipado inmunológico se ha obtenido mediante marcajes superficiales de las PBMCs con los anticuerpos monoclonales descritos en la **Tabla 1**. Para el estudio de **linfocitos B** se ha realizado el marcaje de 100

$\mu$ L de muestra con anti-CD27 (FITC), anti-CD24 (PE), anti-CD19 (PC5.5), anti-CD38 (PC7), anti-CD5 (APC), anti-CD10 (APC-750), anti-CD21 (PB) y anti-CD20 (KO). Para el estudio de **linfocitos T** se han analizado linfocitos T de memoria y *naïve*, células T reguladoras y subpoblaciones de células T *helper*. Para el estudio de **linfocitos T de memoria (CM, EM, TEMRA) y naïve** se ha realizado el marcaje de 100  $\mu$ L de muestra con anti-CD62L (FITC), anti-CD45RO (PE), anti-CD8 (PC5.5), anti-CD127 (PC7), anti-CD25 (APC), anti-CD4 (APC-750) y anti-CD3 (PB). Para el estudio de **células T reguladoras** se ha realizado el marcaje de 100  $\mu$ L de muestra con anti-CD27 (FITC), anti-CD25 (PE), anti-CD127 (PC7) y anti-CD4 (APC-750). Para el estudio de las subpoblaciones de **células T helper (Th1, Th2 y Th17)** se ha realizado el marcaje de 100  $\mu$ L de muestra con anti-CD183 (FITC), anti-CXCR5 (PE), anti-CD4 (PC5.5), anti-CD196 (PC7), anti-CD19 (APC), anti-PD1 (APC-700), anti-CD294 (APC-750), anti-CD3 (PB) y anti-CD45 (KO); de manera adicional, se ha realizado un ensayo para la cuantificación intracitoplasmática de citocinas en subpoblaciones de T *helper* que se encuentra descrito individualmente en un apartado posterior. Para el estudio de **MDSCs** se ha realizado el marcaje de 100  $\mu$ L de muestra con anti-CD3 (FITC), anti-CD14 (FITC), anti-CD19 (FITC), anti-CD56 (FITC), anti-CD124 (PE), anti-CD14 (ECD), anti-CD11b (PC7), anti-CD33 (APC), anti-CD16 (APC-750), anti-CD15 (PB) y anti-HLA-DR (KO). Y para el estudio de **células linfoides innatas** se ha realizado el marcaje de 300  $\mu$ L de muestra con anti-CD3 (FITC), anti-CD14 (FITC), anti-CD19 (FITC), anti-CD56 (FITC), anti-CD117 (PE), anti-CD45 (PC5.5), anti-CD127 (PC7), anti-CD336 (APC), anti-CD-294 (APC-750).

Posteriormente, las PBMCs marcadas se han incubado a temperatura ambiente durante 20 minutos en condiciones de oscuridad, se han lavado con 2 mL de PBS no estéril. A la población de MDSCs se ha añadido 1,5  $\mu$ L del marcador de viabilidad 7AAD (PC5.5) y se ha incubado durante 10 minutos. La población de células T reguladoras se ha permeabilizado con las soluciones permeabilizadoras, marcado intranuclearmente con anti-FoxP3 (PB), incubado durante 30 minutos en frío y oscuridad, y lavado con 2mL de PBS no estéril. Las distintas poblaciones celulares se han adquirido con el citómetro de flujo Cytoflex y se han analizado con el software Kaluza.

#### *Análisis inmunofenotípico de inmuno checkpoints a nivel basal y tras estimulación*

Para el estudio de **inmuno checkpoints** se ha realizado un **marcaje basal** de 100  $\mu$ L de muestra con anti-LAG3 (FITC), anti-ICOSL (PE), anti-CTLA-4 (ECD), anti-BTLA (PC5.5), anti-CD3 (PC7), anti-PD1 (APC-700), anti-CD4 (APC-750) y anti-PDL1 (PB).

Se ha incubado durante 20 min a temperatura ambiente y en oscuridad, y se ha lavado con 2 mL de PBS no estéril.

Se ha realizado un **segundo marcaje** de 100  $\mu$ L de muestra en el que se ha estimulado la producción linfocitaria con el agente mitogénico fitohemaglutinina (PHA) [2'5  $\mu$ g/mL]. Se ha cultivado con medio R10 en la estufa a una temperatura de 37° C durante 72 horas. Posteriormente, se ha lavado con 2 mL de PBS no estéril.

Ambos marcajes se han adquirido con el citómetro de flujo Cytoflex y se han analizado con el software Kaluza.

#### *Ensayo de estimulación para la cuantificación intracitoplasmática de citocinas*

Para la detección intracitoplasmática de **citocinas** se ha hecho un cultivo de 100  $\mu$ L de muestra sanguínea y se ha tratado con el inhibidor de la secreción celular Brefeldin A (Sigma) [500  $\mu$ g/mL], con el ionóforo Ionomicina (Sigma) [50  $\mu$ g/mL] para aumentar el calcio intracelular y con forbol miristato acetato (PMA) [100  $\mu$ g/mL] para estimular la activación de células T, la proliferación y la producción de citocinas. Se ha cultivado con medio R10 en la estufa a una temperatura de 37° C durante 4 horas. Posteriormente, se ha lavado con 2 mL de PBS no estéril y se ha comenzado con el marcaje.

Se ha realizado un **marcaje extracelular** de la muestra cultivada en el que se ha utilizado 1'5  $\mu$ L de anti-CD4 (APC-750) y 1'5  $\mu$ L anti-CD3 (PB). Se ha incubado durante 20 min a temperatura ambiente y en oscuridad, y se ha lavado con 2 mL de PBS no estéril. Se ha permeabilizado con la solución permeabilizadora e incubado durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación, se ha lavado con 1mL de PBS+BSA al 0'5%.

Seguidamente, se ha realizado un segundo **marcaje intracelular** de la muestra marcada extracelularmente en el que se ha utilizado 1'5  $\mu$ L de anti-IL-17 (FITC), 1'5  $\mu$ L de anti-IFN-G (PE) y 1'5  $\mu$ L de anti-IL-2 (APC). Se ha incubado durante 20 min a temperatura ambiente y en oscuridad, y se ha lavado con 2 mL de PBS no estéril. Finalmente, se ha adquirido con el citómetro de flujo Cytoflex y se ha analizado con el software Kaluza.

#### *Análisis estadístico*

Los resultados se han expresado como mediana y rango intercuartílico. Las comparaciones entre grupos se han realizado con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis debido a que los datos no se distribuían normalmente. Los análisis se han realizado

utilizando el software estadístico IBM SPSS (versión 22.0) y el GraphPad Prism (versión 6). Los valores de “p” de 0,05 o inferiores se han considerado significativos.

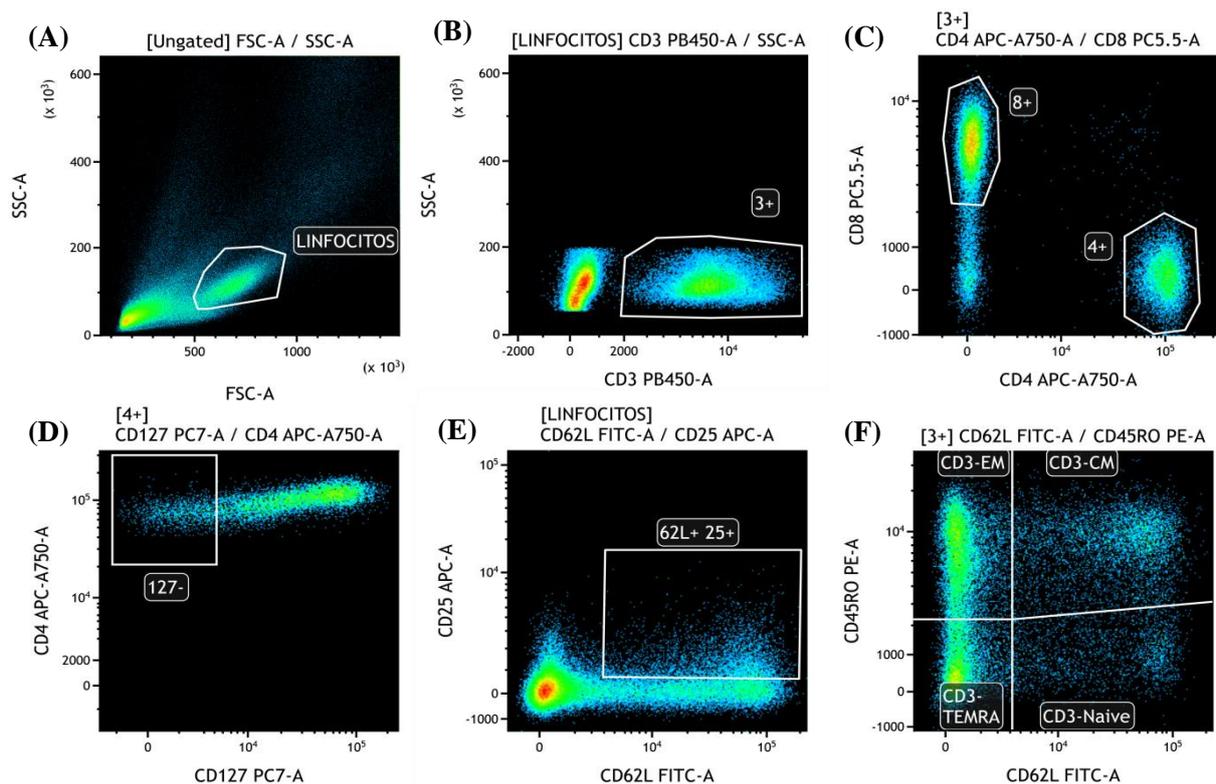
Los valores de referencia de los controles sanos se han expresado como mediana e intervalo de confianza (IC) cuando los datos no se distribuían normalmente, y como media y desviación estándar cuando éstos se distribuían normalmente.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 PUESTA A PUNTO DE LOS PANELES DE CITOMETRÍA DE FLUJO EN SANGRE

Con el objetivo de caracterizar el fenotipo de las poblaciones analizadas en este estudio, se han elaborado diferentes paneles de citometría de flujo con diversas estrategias de gateado.

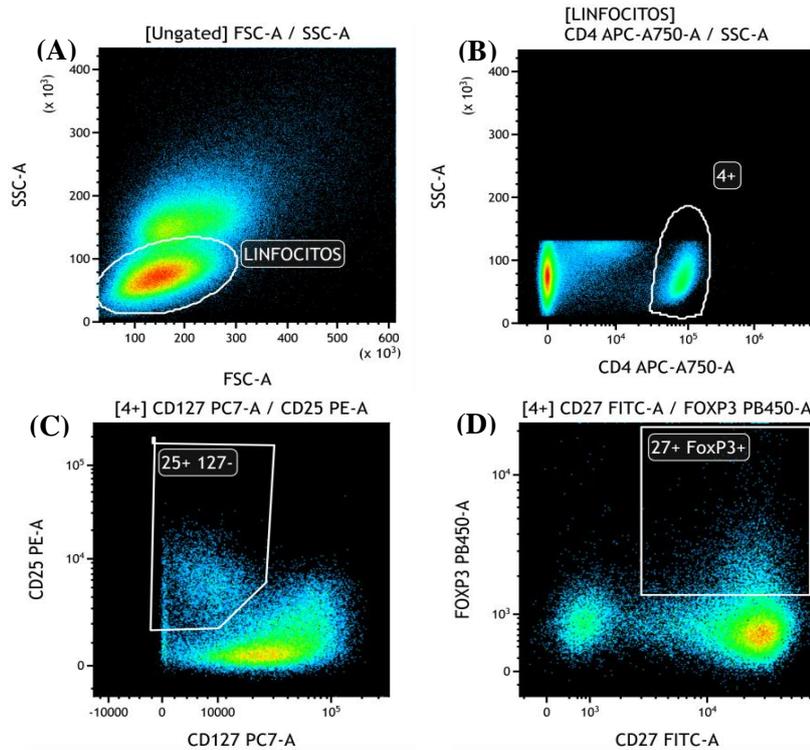
La estrategia de gateado del panel de análisis de las subpoblaciones de linfocitos T (**Figura 3**) ha permitido caracterizar el fenotipo de **células T reguladoras (T reg)** (CD127-CD62L+CD25+), así como el de células **T naïve** (CD62L+CD45RO-CD45RA+), **memoria centrales (CM)** (CD62L+CD35RO+), **memoria efectoras (EM)** (CD62L-CD45RO+) y **memoria efectoras RA (TEMRA)** (CD62L-CD45RO-CD34RA+).



**Figura 3. Análisis por citometría de flujo de las poblaciones efectoras, memoria y virgen de linfocitos T.**

Población linfocitaria en función del tamaño y de la densidad (A). A partir de la población linfocitaria se selecciona la población CD3+ (B). En la población CD3+ se analizan las células CD8+ y las CD4+ (C). Para el análisis de las células Treg, en la población CD4+ se escogen las células CD127- (D) y en la linfocitaria las de fenotipo CD62L+CD25+ (E). Análisis de la diferenciación de células T a partir de la población CD3+ y en función de CD62L y CD45RO: CM, EM TEMRA y naïve (F).

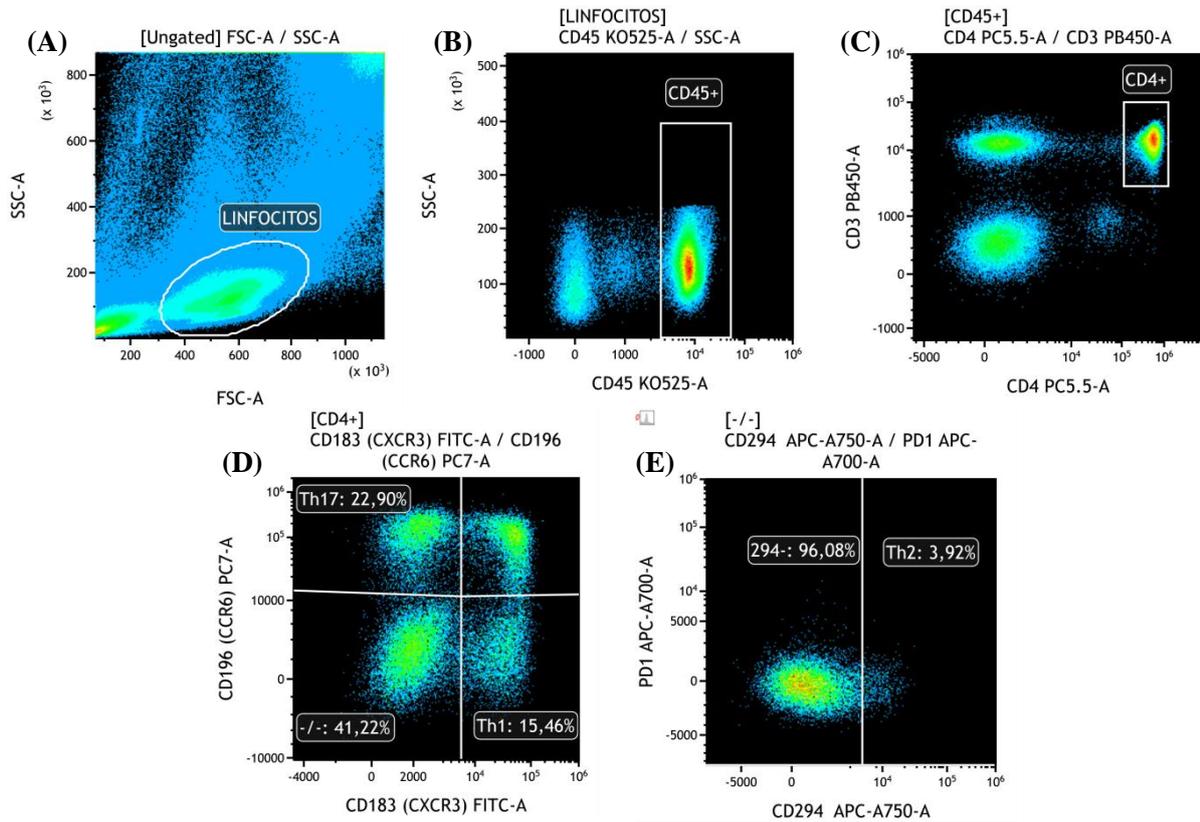
Se ha incluido también otro análisis más específico de las **células T reguladoras** (CD127-CD25+CD27+FoxP3+) (**Figura 4**) en el que se incluyen los marcadores CD27 y FoxP3, siendo este último de carácter intranuclear.



**Figura 4. Análisis por citometría de flujo de las células T reguladoras (Treg).**

Población linfocitaria en función del tamaño y de la densidad (A). A partir de la población linfocitaria se analiza la población CD4+ (B). En la población CD4+ se escogen las células CD25+CD127- (C) y las CD27+FoxP3+ (D).

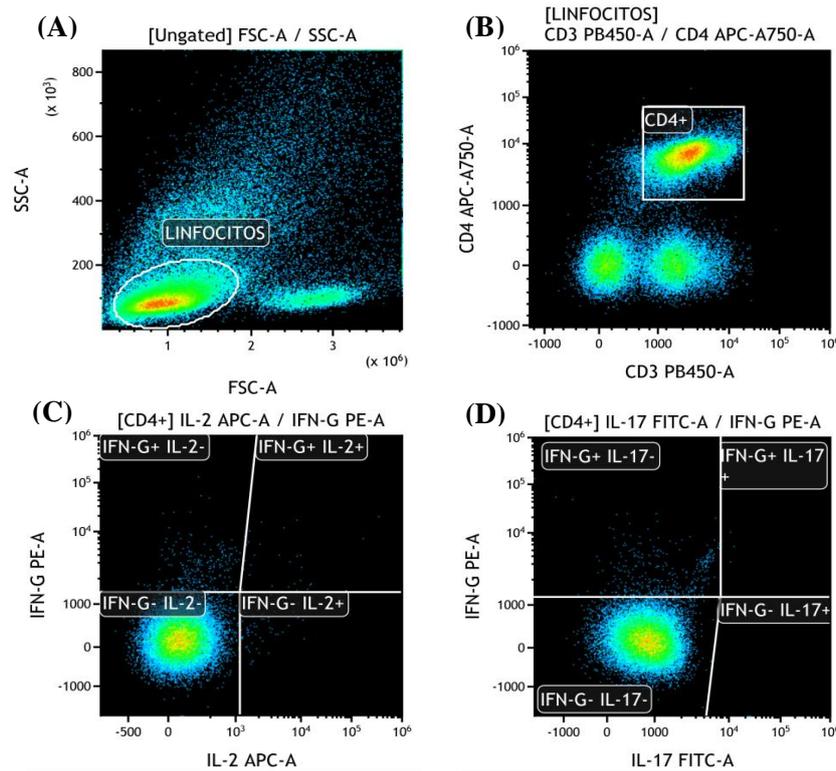
Se ha elaborado un panel de citometría para analizar las principales subpoblaciones de células T *helper* (**Figura 5**): **Th1** (CXCR3+CCR6-), **Th2** (CXCR3-CCR6-CD294+) y **Th17** (CXCR3-CCR6+). Para el análisis del subtipo Th2, se ha hecho una selección posterior de las células CD294+ a partir de las células doble negativas para los marcadores CXCR3 y CCR6 (-/-).



**Figura 5. Análisis por citometría de flujo de las células T helper**

Población linfocitaria en función del tamaño y de la densidad (A). A partir de la población linfocitaria se analiza la población CD45+ (B). En la población CD45+ se analizan las células CD4+ (C). A partir de la población CD4+ se analizan dos subtipos de T helper (Th1 y Th17) y la población -/-, negativa para los marcadores CD183 y CD196. (D). Se analiza el subtipo de T helper Th2 (CD294+) a partir de la población -/- (E).

Y, adicionalmente, se ha elaborado otro panel de citometría para el análisis de la cuantificación intracitoplasmática de citocinas en subpoblaciones de células T helper (Figura 6), analizando la producción de IL-2 e IFN $\gamma$  (Th1) e IL-17 (Th17).



**Figura 6. Detección por citometría de flujo de citocinas intracitoplasmáticas en subpoblaciones de células T helper.**

Población linfocitaria en función del tamaño y de la densidad (A). A partir de la población linfocitaria se analiza la población CD4+ (B). Se analiza la producción de IL-2 e IFN $\gamma$  (C) y de IL-17 e IFN $\gamma$  (D).

En el siguiente panel (**Figura 7**), se han utilizado varios marcadores de diferenciación de células B para analizar aquellas que se encuentran en la primera fase de diferenciación (PreB-I y II), en estadio inmaduro, en proceso maduración (tres estadios: T1, T2 y T3-T3'), maduras como son las foliculares y células de la zona marginal esplénica (MZ-B), naïve o vírgenes, y en estado plasmático, donde secretan un determinado isotipo de anticuerpo (16). El inmunofenotipo de estas subpoblaciones se define como:

**PreB-I:** CD10+CD19+CD20-

**PreBII:** CD10+CD19+CD20+

**Inmaduras:** CD10+CD19+CD20+CD21-CD5+<sup>high</sup>

**T1:** CD10+CD19+CD20+CD21+CD5+<sup>high</sup>CD24+<sup>high</sup>CD38+<sup>high</sup>

**T2:** CD10+CD19+CD20+CD21+CD5+<sup>low</sup>CD24+CD38+

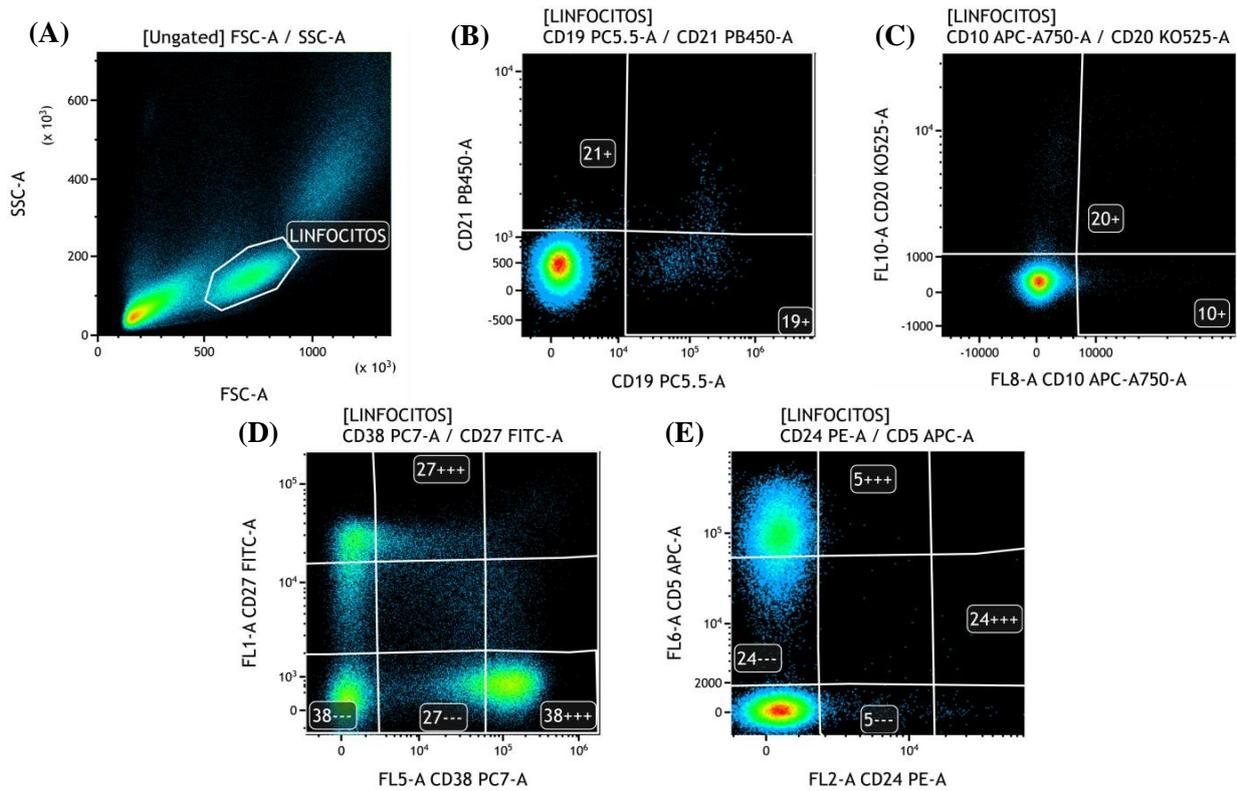
**T3-T3':** CD10-CD19+CD20+CD21+CD5-CD24+CD38+

**B foliculares:** CD19+CD20+CD21+CD24+CD38+

**MZ-B:** CD19+CD20+CD21+CD24+<sup>high</sup>CD38-

**Naïve:** CD10-CD19+CD20+CD21+CD5-CD24+CD38+CD27-

**Plasmáticas:** CD19-CD20-CD21-CD24-CD38+<sup>high</sup>CD27+<sup>high</sup>

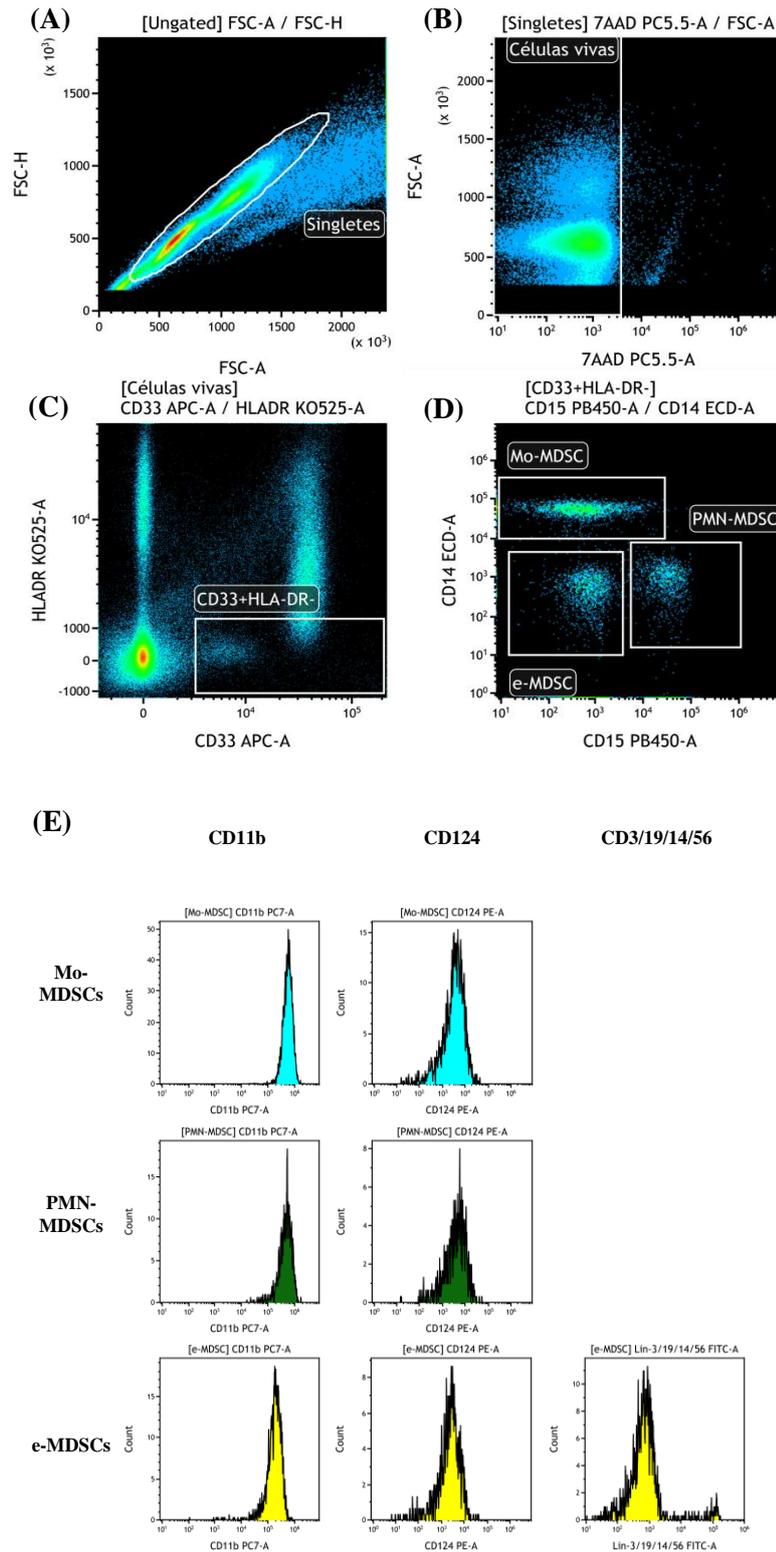


**Figura 7. Análisis por citometría de flujo de linfocitos B durante sus distintos estadios de diferenciación periférica desde célula B inmadura.**

Población linfocitaria en función del tamaño y de la densidad (A). A partir de la población linfocitaria se analizan diversos marcadores de diferenciación B: CD19 y CD21 (B), CD10 y CD20 (C), CD38 y CD27 (D) y CD24 y CD5 (E). Mediante el uso de estos marcadores se identifican las siguientes subpoblaciones: PreB-I, PreB-II, inmaduras, T1, T2, T3-T3', foliculares, de la zona marginal, *naïve* y plasmáticas.

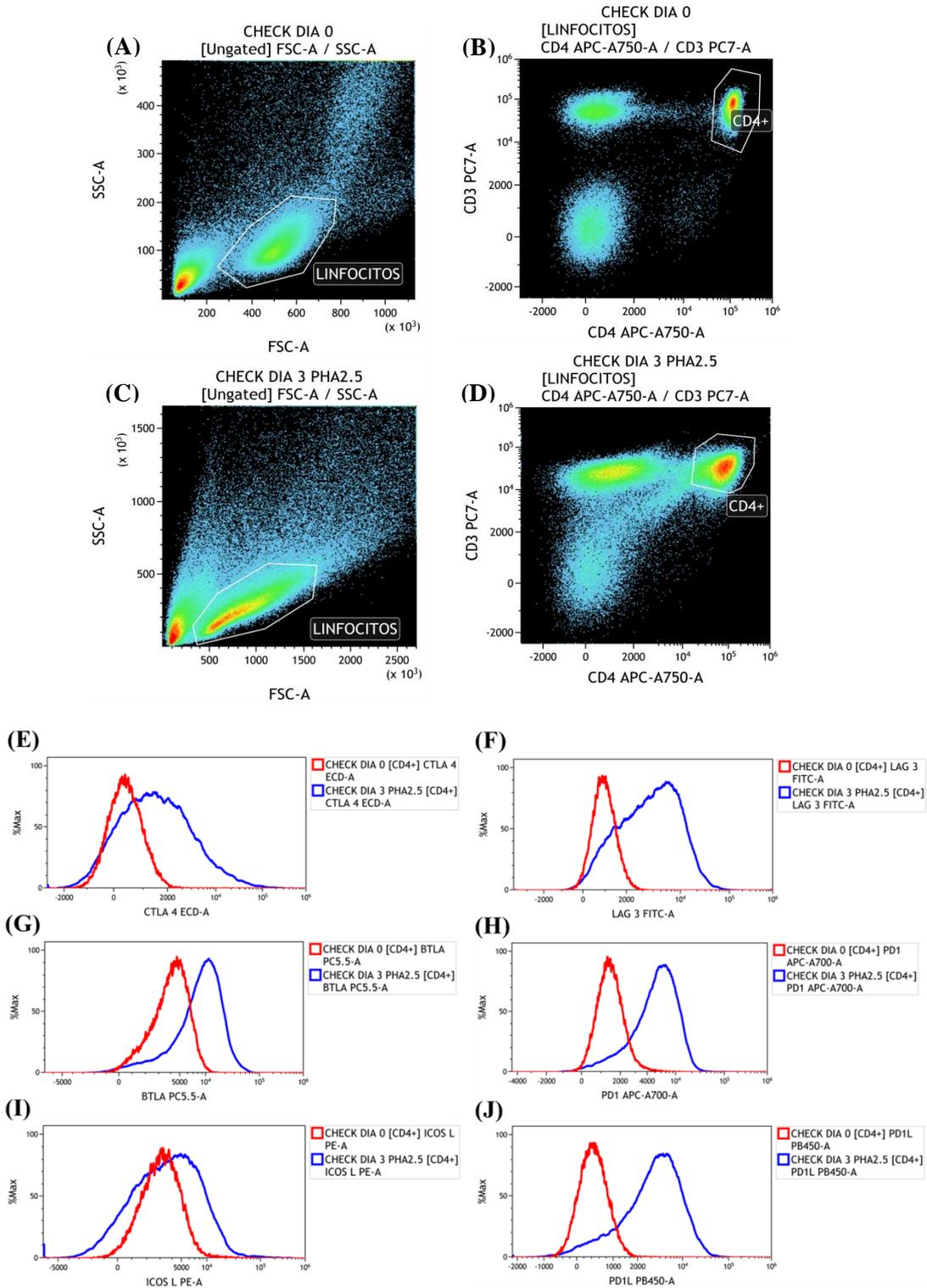
En el panel de análisis de las células mieloides supresoras (MDSCs) (Figura 8), con un previo gateado de las células vivas marcadas con un compuesto químico fluorescente llamado 7-aminoactinomicina D (7AAD) y utilizado como marcador de viabilidad, se ha realizado un análisis de las tres subpoblaciones principales a partir de las células CD33+HLA-DR-: **monocíticas (M-MDSCs)** (CD33+HLA-DR-CD11b+CD14+CD15-), **polimorfonucleares (PMN-MDSCs)** (CD33+HLA-DR-CD11b+CD14-CD15+) y **early-stage (eMDSCs)** (CD33+HLA-DR-CD11b+CD3-CD19-CD14-CD56-). También se ha mostrado la expresión, o la falta de la misma, de otros marcadores en estas tres poblaciones de MDSCs (Figura 8E).

En cuanto al panel realizado para el análisis de la expresión de *immune checkpoints* (Figura 9), tras el gateado de los linfocitos T CD4+, se ha comparado la expresión a día 0 (rojo) y tras estimulación (azul) con el agente mitogénico fitohemaglutinina (PHA) a los tres días.



**Figura 8. Análisis por citometría de flujo de las células mieloides supresoras (MDSCs).**

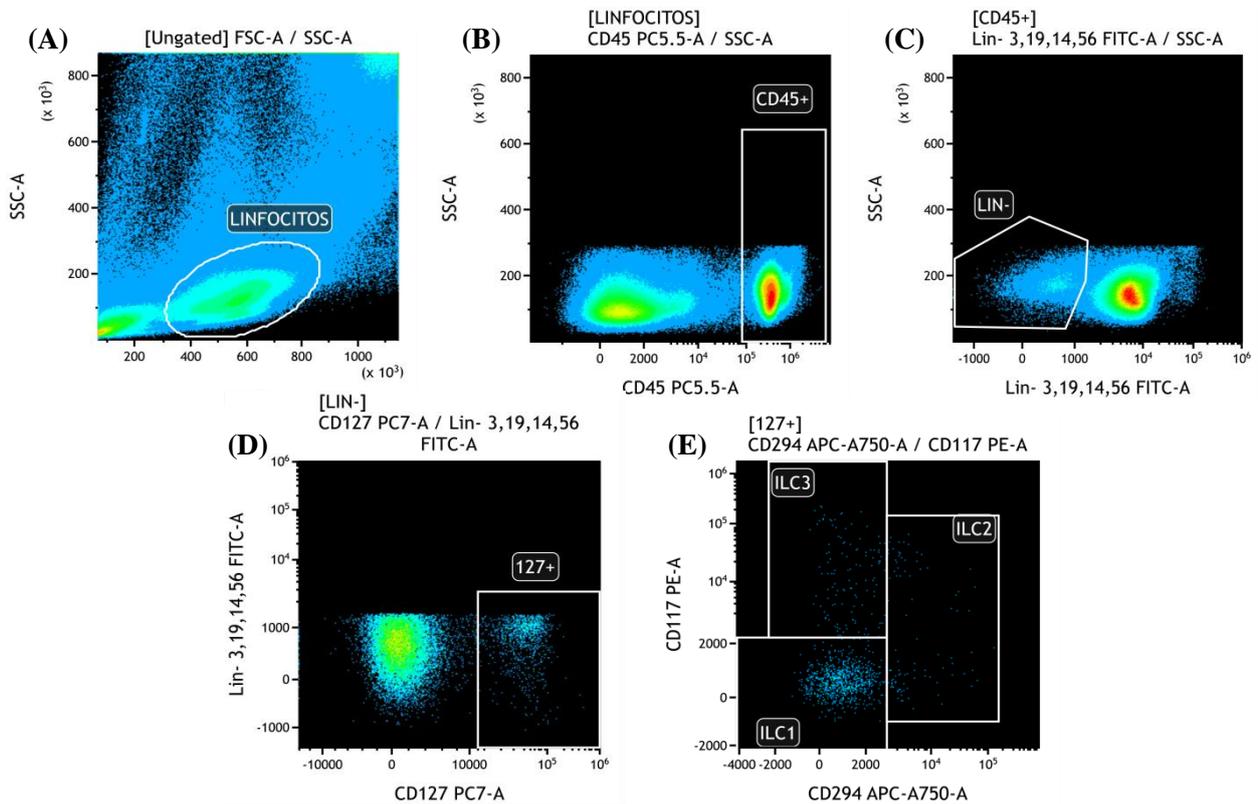
Singletes en función del tamaño en área y en altura (A). Se seleccionan las células vivas a partir de los singletes con 7AAD (B). Análisis de las células CD33+HLA-DR- vivas (C). Se diferencian las tres subpoblaciones de interés (MDSCs monocíticas, polimorfonucleares y early-stage) de la población CD33+HLA-DR- mediante la expresión de CD15 y CD14 (D). Expresión de los marcadores CD11b y CD124 en las tres subpoblaciones de MDSCs; falta de expresión de CD3/19/14/56 (Lin-) en e-MDSCs (E).



**Figura 9.** Análisis por citometría de flujo de expresión de *immune checkpoints* en el día 0 y a los 3 días tras estimulación con PHA.

Población linfocitaria en función del tamaño y de la densidad (A y C). A partir de la población linfocitaria se analiza la población CD4+ (B y D). Comparación de la expresión a día 0 y a los 3 días de los siguientes *immune checkpoints*: CTLA-4 (E), LAG-3 (F), BTLA (G), PD-1 (H), ICOS-L (I), PDL-1 (J).

Por último, la estrategia de gateado del panel de análisis de las células linfoides innatas (**Figura 10**) ha permitido identificar los tres subtipos principales enfrentando los marcadores CD294 y CD117: **ILC1** (lin-CD127+CD294-CD117-), **ILC2** (lin-CD127+CD294+), e **ILC3** (lin-CD127+CD294-CD117+).



**Figura 10.** Análisis por citometría de flujo de las células linfoides innatas en sangre periférica.

Población linfocitaria en función del tamaño y de la densidad (A). A partir de la población linfocitaria se analiza la población CD45+ (B). En la población CD45+ se analizan las células linaje negativas (LIN-; CD3-, CD19-, CD14- y CD56-) (C). A partir de la población LIN- se analizan las células CD127+ (D). Se analizan los tres subtipos principales de ILC (ILC1, ILC2 e ILC3) a partir de las células CD127+ (E).

## 4.2 VALORES DE REFERENCIA DE LA POBLACIÓN NORMAL

En la tabla siguiente se muestran los valores de referencia obtenidos en la población control sana adquirida de donantes de sangre sanos.

VALORES DE REFERENCIA DE CONTROLES SANOS (células/mm <sup>3</sup> )			
LB		<b>B Foliculares</b>	22,91 - 43,34
		<b>IMMAT</b>	0,07 - 0,26
		<b>Linfocitos</b>	1657,02 - 2968,98
		<b>MZ-B</b>	3,68 - 8,68
		<b>Naïve</b>	13,28 - 22,04
		<b>Plasmáticas</b>	21,11 - 69,64
		<b>PreB-I</b>	0,13 - 0,39
		<b>PreB-II</b>	24,84 - 56,41
		<b>T1</b>	0 - 0,04
		<b>T2</b>	6,42 - 16,31
		<b>T3-T3'</b>	6,66 - 13,29
LT EFECTORES, MEMORIA Y NAÏVE		<b>CD4+</b>	713,3 - 912,5
		<b>CD8+</b>	301,9 - 388,6
		<b>CD4-CM</b>	246,5 - 305
		<b>CD4-EM</b>	63,82 - 94,27
		<b>CD4-Naive</b>	353,4 - 506,2
		<b>CD4-TEMRA</b>	2,09 - 4,69
		<b>CD8-CM</b>	31,7 - 41,42
		<b>CD8-EM</b>	31,21 - 65,49
		<b>CD8-Naive</b>	142 - 196,2
		<b>CD8-TEMRA</b>	32 - 64,47
		<b>Linfocitos</b>	1646,97 - 2808,93
	<b>TREG</b>	18,16 - 49,22	
INMUNOCHECKPOINTS	DÍA 0	<b>BTLA+</b>	1,39 - 4,52
		<b>CD4+</b>	637,3 - 1017
		<b>CTLA4+</b>	1,60 - 21,29
		<b>ICOS-L+</b>	12,76 - 32,48
		<b>LAG3+</b>	0,86 - 2,5
		<b>PD1+</b>	2,66 - 8,96
		<b>PDL1+</b>	0,16 - 16,83
	DÍA 3	<b>BTLA+</b>	49,15 - 163,66
		<b>CD4+</b>	552,1 - 953,6
		<b>CTLA4+</b>	38,34 - 246,18
		<b>ICOS-L+</b>	-7,00 - 351,72
		<b>LAG3+</b>	101,1 - 470,5

	<b>PD1+</b>	34,68 – 186,40
	<b>PDL1+</b>	185,58 - 691,74
<b>MDSCs</b>	<b>CD33+DR-</b>	36,02 - 73,93
	<b>CD33+DR-CD14+</b>	7,74 - 14,51
	<b>Lin-CD33+DR-DN</b>	3,92 - 6,5
	<b>CD33+DR-CD15+</b>	9,94 - 25,37
	<b>CD33+DR-CD14+CD11b+CD124+</b>	7,56 - 13,89
	<b>CD33+DR-CD15+CD11b+CD124+</b>	7,45 - 20,52
	<b>Lin-CD33+DR-DN CD124+</b>	3,39 - 5,53
<b>THELPER</b>	<b>B Foliculares</b>	114,6 - 167,2
	<b>CD19+</b>	121,5 - 187,8
	<b>CD4+</b>	467,93 - 934,77
	<b>CD45+</b>	1101,98 - 2005,69
	<b>Th1</b>	82,92 - 131,1
	<b>Th17</b>	55,72 – 126,30
	<b>Th2 (CD294+)</b>	2,96 - 10,55
<b>CITOCINAS</b>	<b>CD4+</b>	636,91 - 1636,69
	<b>IFN-G- IL-17+</b>	1,39 - 3,97
	<b>IFN-G- IL-2-</b>	627,25 - 1608,33
	<b>IFN-G- IL-2+</b>	1,77 - 9,96
	<b>IFN-G+ IL-2-</b>	4,45 - 20,81
	<b>IFN-G+ IL-2+</b>	0,33 - 0,71
<b>TREG</b>	<b>CD4+</b>	672,45 - 1141,28
	<b>TREG</b>	33,38 - 49,24
<b>ILC</b>	<b>127+</b>	5,13 - 8,69
	<b>CD45+</b>	1096,27 - 2034,09
	<b>ILC1</b>	2,86 - 6,66
	<b>ILC2</b>	0,65 - 2,20
	<b>ILC3</b>	0,56 - 1,29
	<b>LIN-</b>	27,75 - 52,64

**Tabla 3.** Valores de referencia de los controles sanos de todas las poblaciones celulares analizadas en el estudio.

Como se ha especificado anteriormente en el apartado de Material y Métodos, los valores de referencia de los sujetos controles sanos se han expresado no paramétricamente como mediana e intervalo de confianza (IC) cuando los datos no se distribuían normalmente, y paramétricamente como media y desviación estándar cuando éstos se distribuían normalmente.

### 4.3 RESULTADOS ESTADÍSTICOS DE LAS POBLACIONES ANALIZADAS

#### 4.3.1 LINFOCITOS T

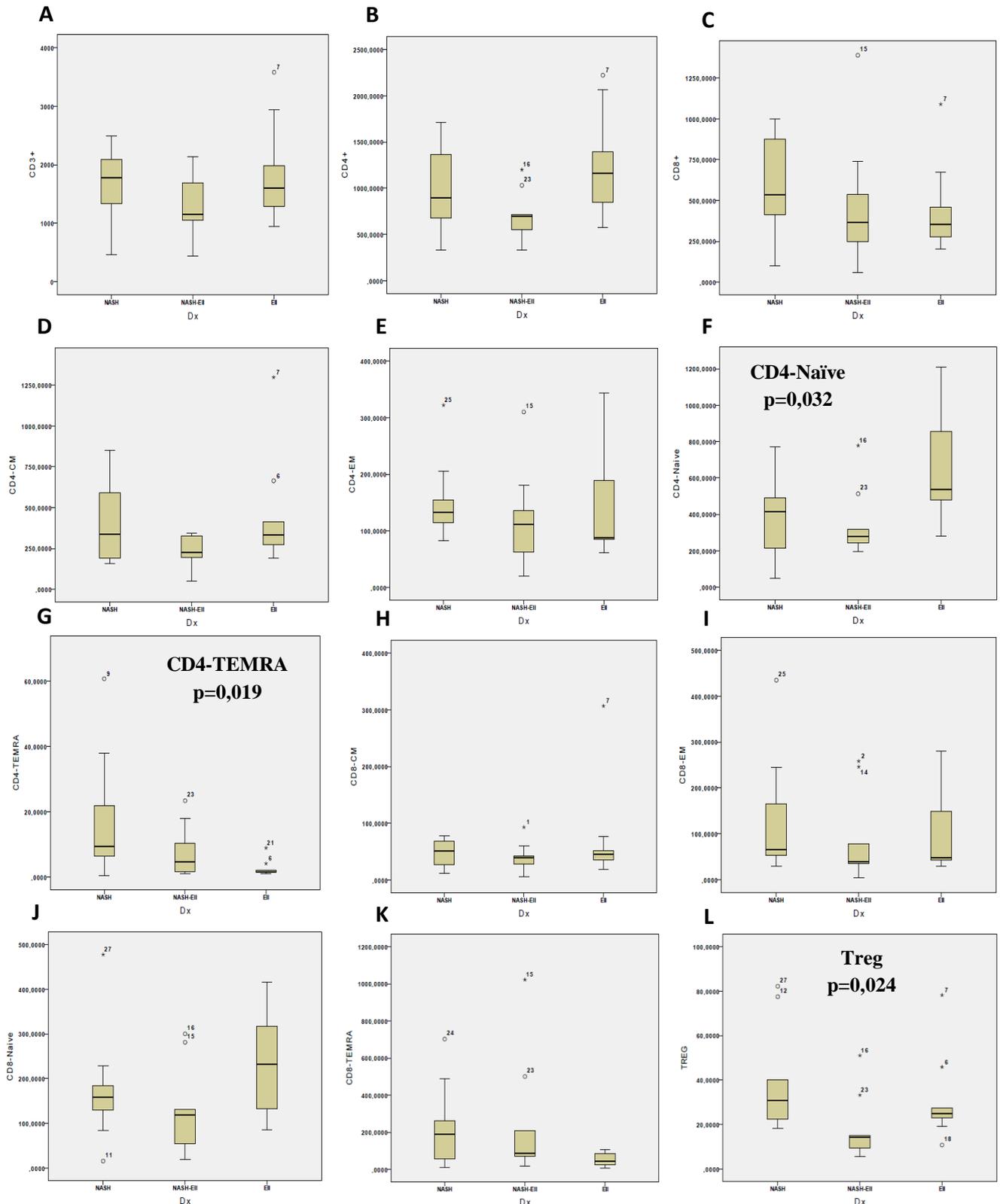
##### 4.3.1.1 Linfocitos T efectores, de memoria (CM, EM, TEMRA) y *naïve*.

El fenotipado inmunológico de las subpoblaciones de linfocitos T efectores, de memoria y *naïve* (**Figura 11**) ha resultado significativo para algunas subpoblaciones, como para las células **CD4-Naïve** ( $p=0,032$ ), donde ha revelado que el grupo de pacientes con EII presenta un número elevado de células por  $\text{mm}^3$  fuera del rango de referencia normal (**Tabla 2**), seguido del grupo con NASH y, por último, el de NASH+EII.

Sin embargo, este mismo grupo con EII ha revelado un número de células **CD4-TEMRA** ( $p=0,019$ ) disminuido con respecto a los otros dos grupos de pacientes y fuera del rango normal. En los grupos con NASH y NASH+EII el valor está más aumentado, siendo NASH el de más valor.

Por otro lado, una población muy relevante en este estudio que ha resultado también significativa es el número de células **Treg** ( $p=0,024$ ). Se encuentra claramente disminuido para el grupo con NASH+EII, con un valor fuera del rango normal, siguiéndole gradualmente el grupo con EII y por último el de NASH.

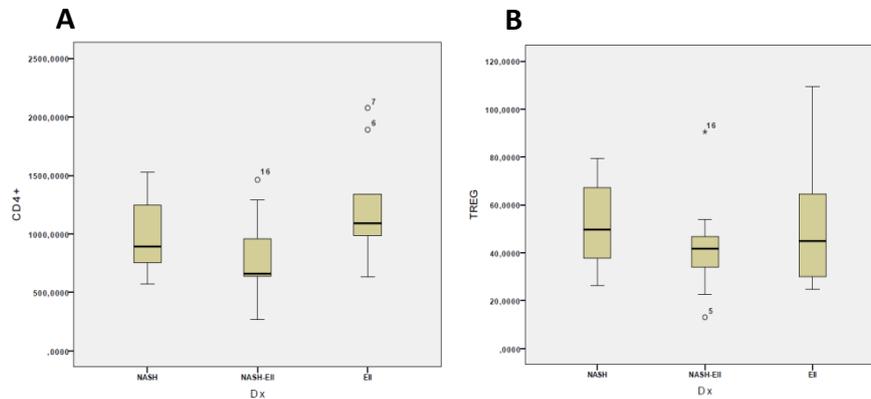
En el resto de poblaciones de linfocitos T efectores, de memoria y *naïve* no se ha encontrado una relación estadísticamente significativa.



**Figura 11.** Box plots comparando tres grupos de pacientes (NASH, NASH coexistente con EII y EII) con cada una de las poblaciones analizadas en el panel de citometría de las poblaciones efectoras, memoria y virgen de linfocitos T: CD3+ (A), CD4+ (B), CD8+ (C), CD4-CM (D), CD4-EM (E), CD4-Naive (F), CD4-TEMRA (G), CD8-CM (H), CD8-EM (I), CD8-Naive (J), CD8-TEMRA (K) y Treg (L).

#### 4.3.1.2 Células T reguladoras FoxP3+

No se han encontrado relaciones significativas entre las células T reguladoras positivas para el marcador Fox P3 y los tres grupos de pacientes (**Figura 12**).



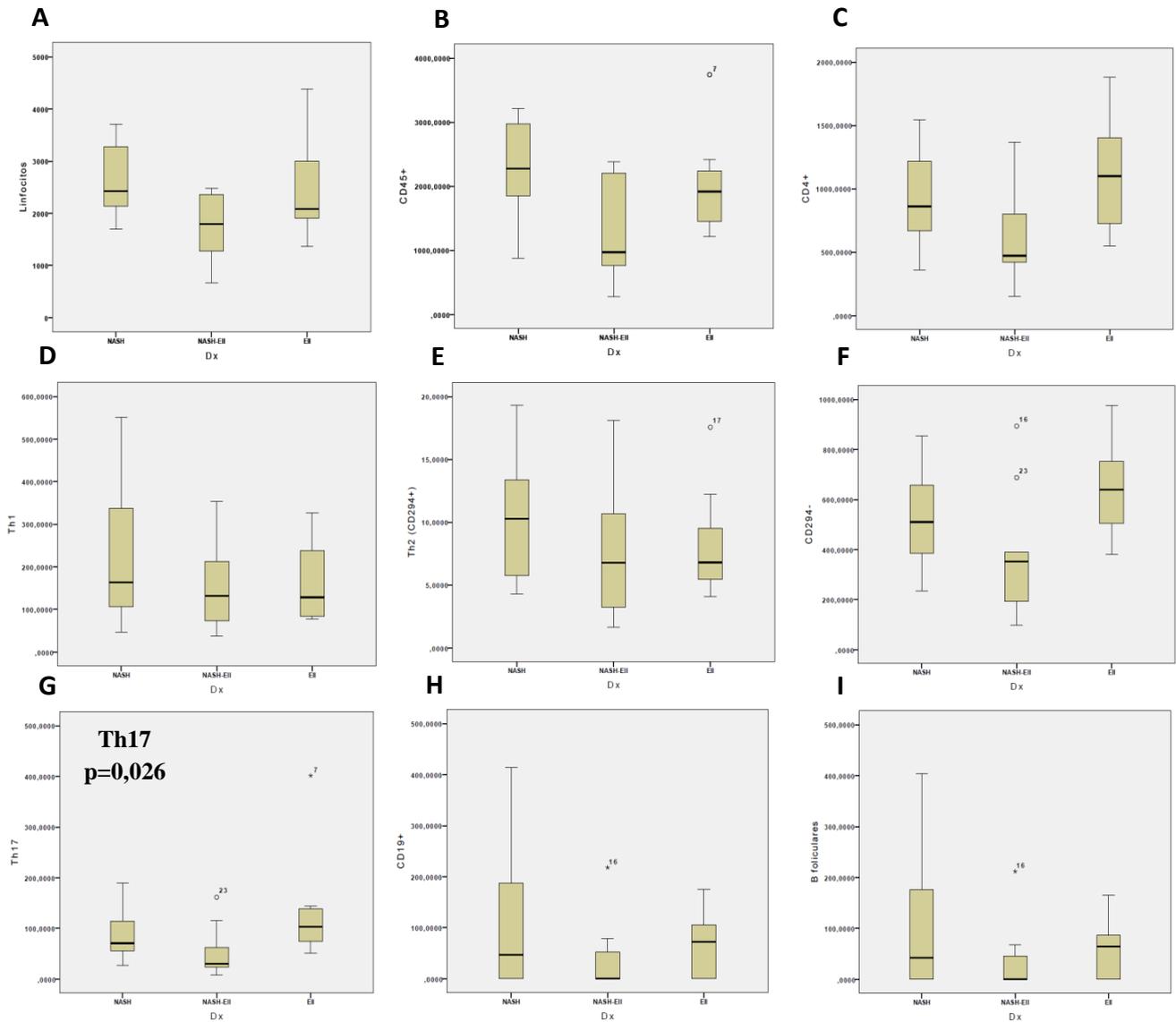
**Figura 12.** Box plots comparando tres grupos de pacientes (NASH, NASH coexistente con EII y EII) con las poblaciones analizadas en el panel de citometría de las células T reguladoras positivas para el marcador intranuclear FoxP3: CD4+ (A), Treg (B).

#### 4.3.1.3 Células T helper (Th1, Th2 y Th17)

Como se ha mencionado con anterioridad, las subpoblaciones de T *helper*, sobre todo Th1 y Th17, son de gran importancia dentro del proceso patogénico inflamatorio tratado en este trabajo, por lo que también se ha estudiado su fenotipo inmunológico (**Figura 13**) y han resultado significativas varias poblaciones.

Una de las subpoblaciones más relevantes y que además ha resultado ser significativa, es el subtipo de T *helper* **Th17** ( $p=0,026$ ), en la cual el grupo de pacientes con NASH+EII presenta un número de células con un valor disminuido y fuera del rango de referencia normal con respecto a los otros dos grupos, correspondiendo el valor más alto al grupo con EII.

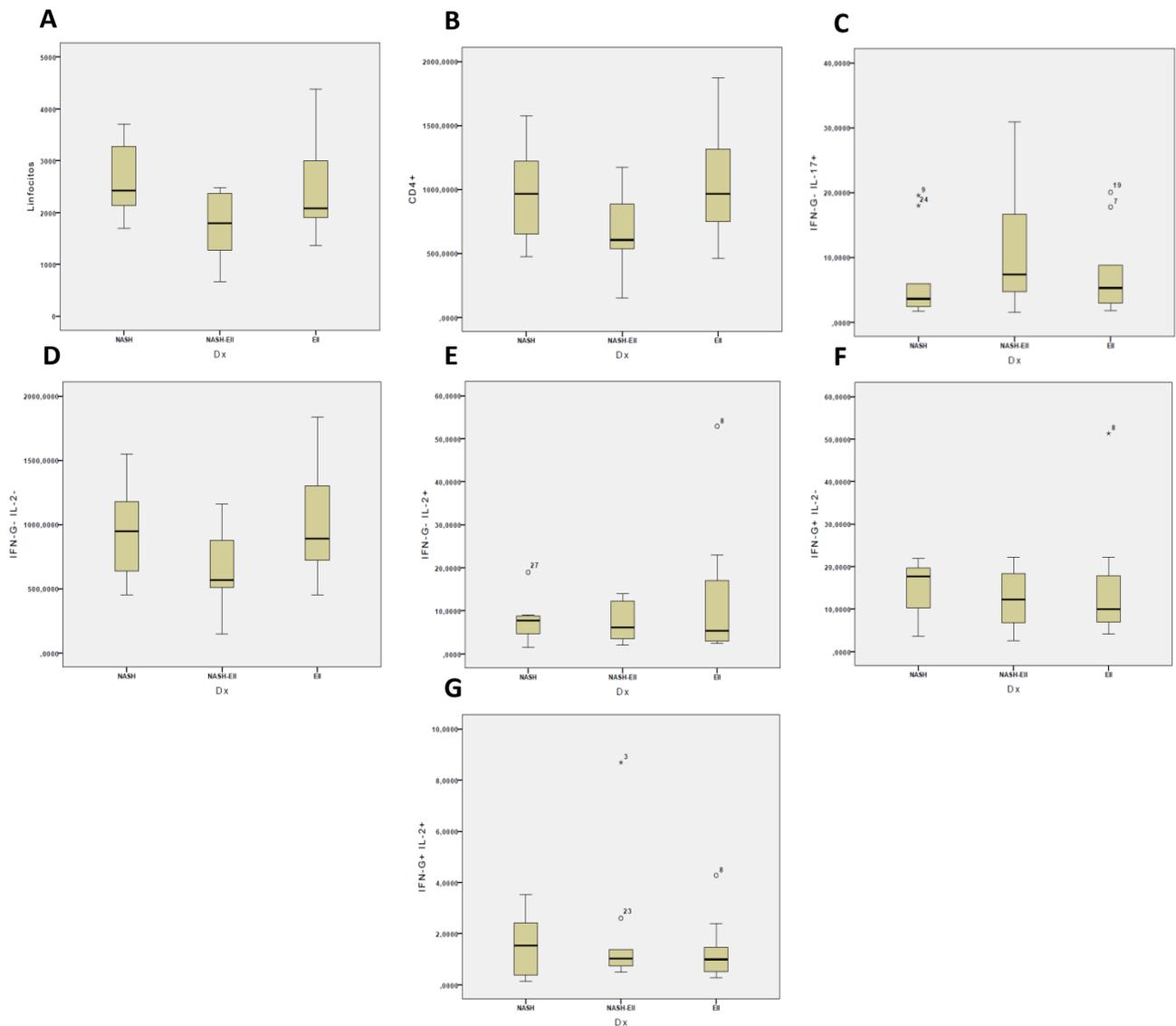
En el resto de poblaciones no se ha encontrado una relación estadísticamente significativa.



**Figura 13.** Box plots comparando tres grupos de pacientes (NASH, NASH coexistente con EII y EII) con cada una de las poblaciones analizadas en el panel de citometría de las subpoblaciones de células T helper (Th1, Th2 y Th17): linfocitos (A), CD45+ (B), CD4+ (C), Th1 (D), Th2 (CD294+) (E), CD294- (F), Th17 (G), CD19+ (H), B foliculares (I).

#### 4.3.1.4 Citocinas intracitoplasmáticas en subpoblaciones de T helper

No se han encontrado relaciones estadísticamente significativas entre las citocinas intracitoplasmáticas en subpoblaciones de T *helper* y los tres grupos de pacientes (**Figura 14**).



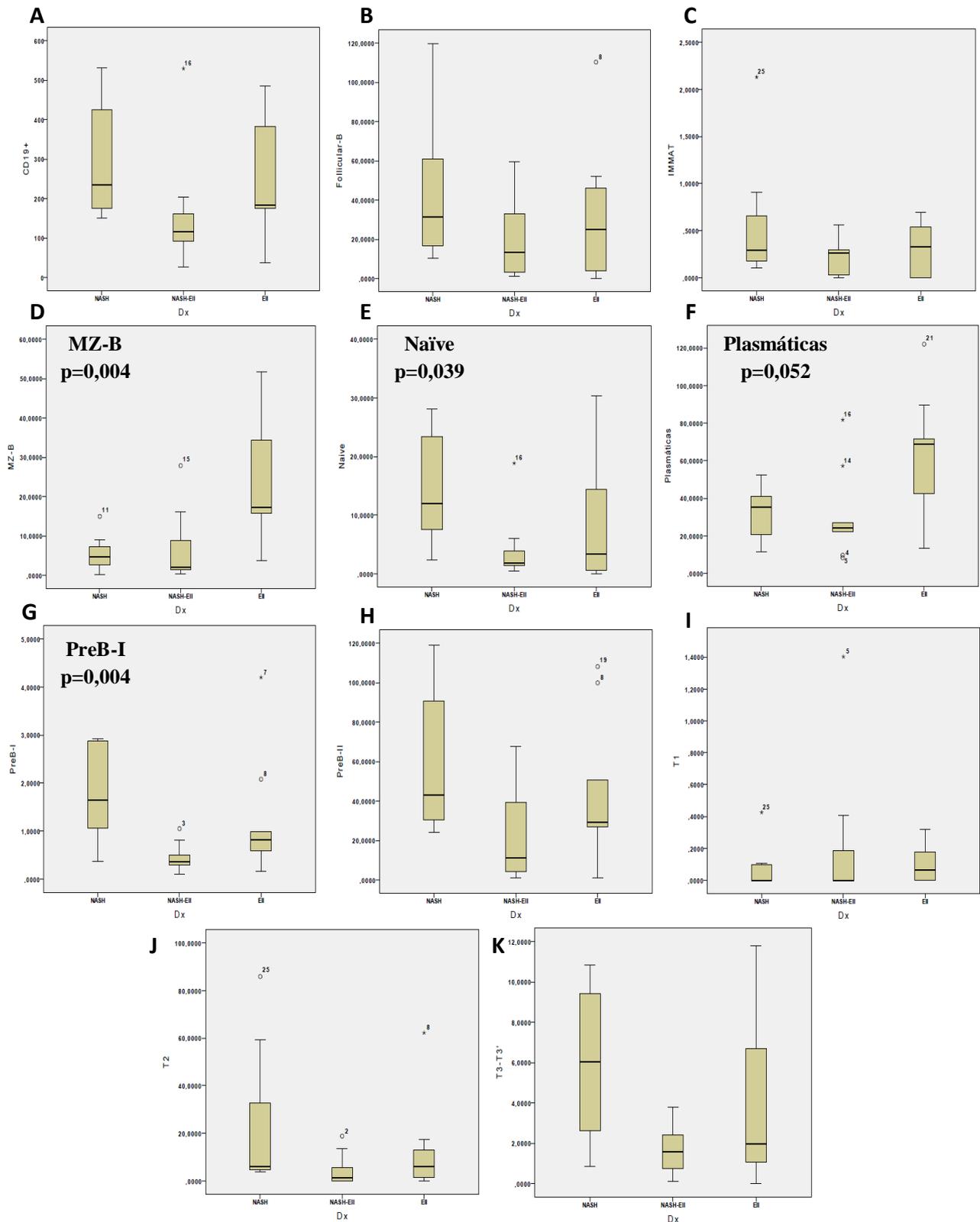
**Figura 14.** *Box plots* comparando tres grupos de pacientes (NASH, NASH coexistente con EII y EII) con cada una de las poblaciones analizadas en el panel de citometría de citocinas intracitoplasmáticas en subpoblaciones de células T *helper*: linfocitos (A), CD4+ (B), IFN-g- IL17+ (C), IFN-g- IL2- (D), IFN-g- IL2+ (E), IFN-g+ IL2- (F), IFN-g+ IL2+ (G).

#### 4.3.2 LINFOCITOS B DURANTE SUS DISTINTOS ESTADIOS DE DIFERENCIACIÓN PERIFÉRICA DESDE CÉLULA B INMADURA.

El fenotipado inmunológico de las subpoblaciones de linfocitos B (**Figura 15**) ha revelado que el grupo de pacientes con NASH+EII presenta un número bajo de células **CD19+** por  $\text{mm}^3$  ( $p=0,048$ ) con respecto a los otros dos grupos de pacientes. El valor del número de células en el grupo con NASH+EII se mantiene bajo para el resto de subpoblaciones que han resultado significativas.

El grupo de pacientes con EII presenta un número de células **MZ-B** ( $p=0,004$ ) y **plasmáticas** ( $p=0,052$ ) notablemente elevado comparado con el menor número del resto de grupos, y con un valor al límite en el rango de referencia normal en el caso de las plasmáticas y claramente fuera en el caso de las células MZ-B; mientras que el grupo de pacientes con NASH presenta un número de células **naïve** ( $p=0,039$ ) y **preB-I** ( $p=0,004$ ) mucho mayor con respecto a los otros dos grupos, ambas subpoblaciones con valores fuera de rango de referencia normal.

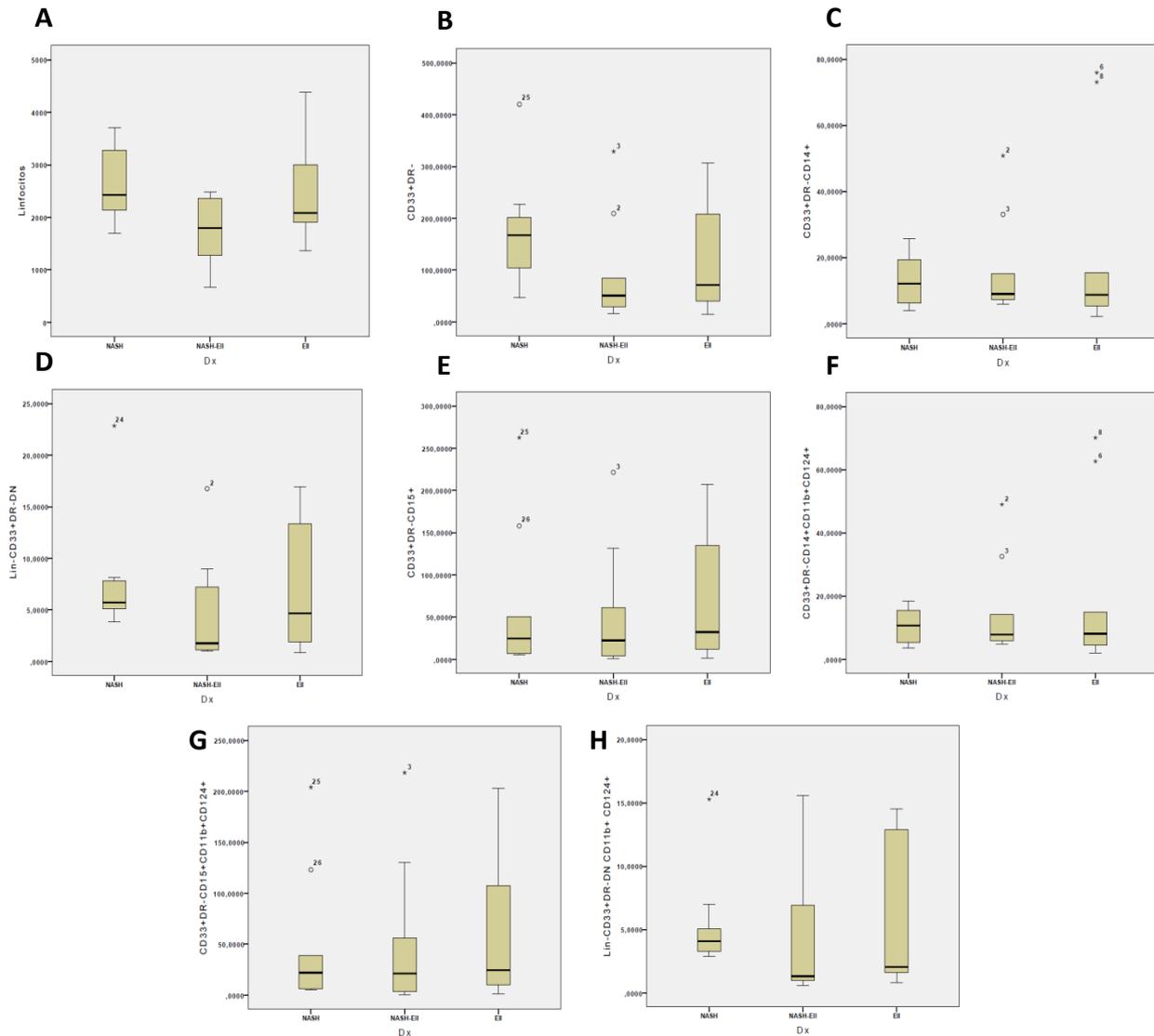
En el resto de poblaciones de linfocitos B no se ha encontrado una relación estadísticamente significativa.



**Figura 15.** Box plots comparando tres grupos de pacientes (NASH, NASH coexistente con EII y EII) con cada una de las poblaciones analizadas en el panel de citometría de los distintos estadios de maduración de linfocitos B desde célula B inmadura : CD19+ (A), B foliculares (B), IMMAT (C), MZ-B (D), Naïve (E), plasmáticas (F), PreB-I (G), PreB-II (H), T1 (I), T2 (J) y T3-T3' (K).

### 4.3.3 MDSCs

No se han encontrado relaciones estadísticamente significativas entre las células mieloides supresoras y los tres grupos de pacientes (**Figura 16**).



**Figura 16.** Box plots comparando tres grupos de pacientes (NASH, NASH coexistente con EII y EII) con cada una de las poblaciones analizadas en el panel de citometría de células mieloides supresoras (MDSCs): linfocitos (A), CD33+DR- (B), CD33+DR-CD14+ (C), lin-CD33+DR-DN (D), CD33+DR-CD15+ (E), CD33+DR-CD14+CD11b+CD124+ (F), CD33+DR-CD15+CD11b+CD124+ (G), lin-CD33+DR-DN CD124+ (H).

#### 4.3.4 ILC

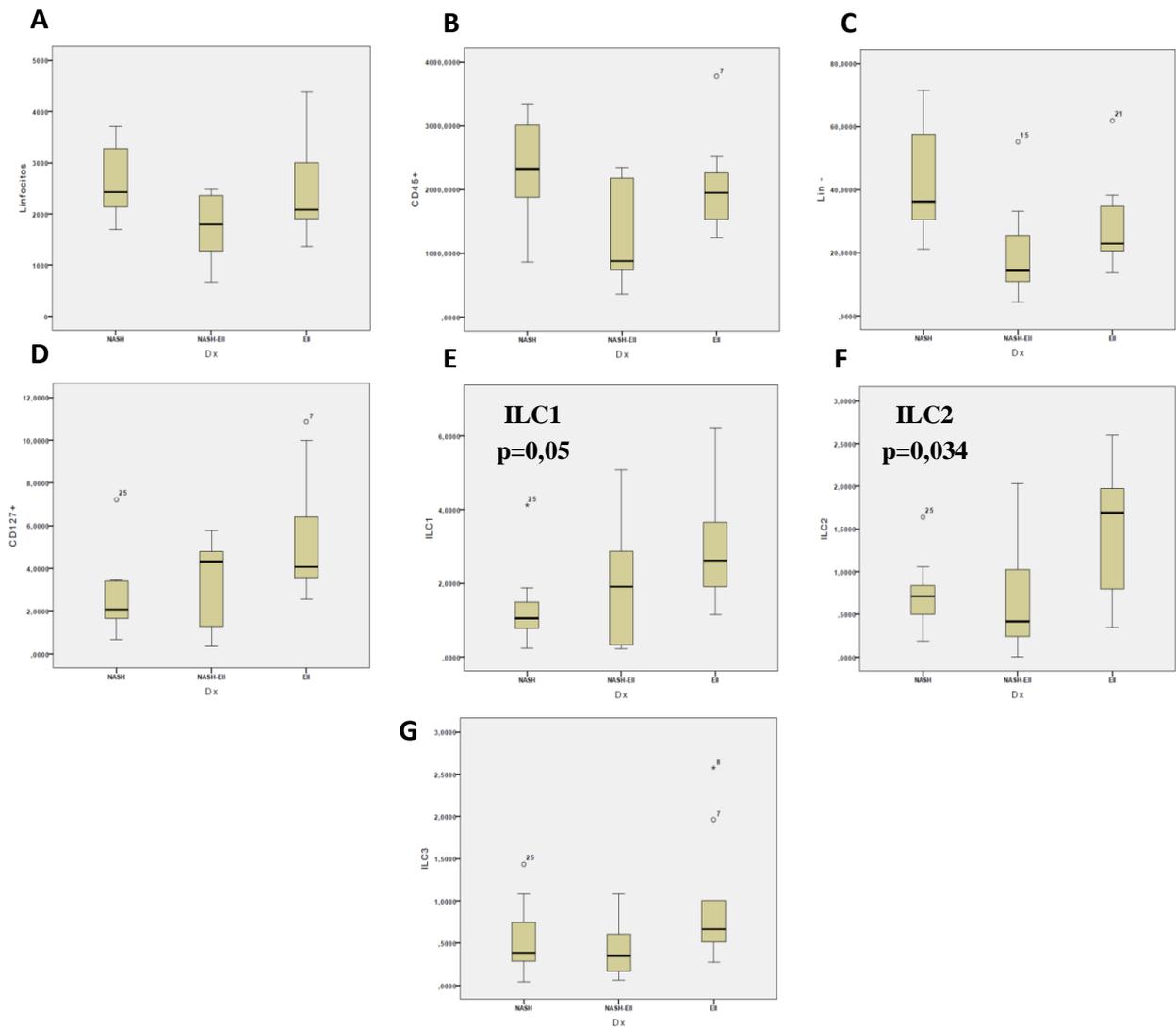
El fenotipado inmunológico de las células linfoides innatas (**Figura 17**), ha revelado que el grupo de pacientes con NASH+EII presenta un número de células con **lin-(CD3-CD19-CD14-CD56-)** ( $p=0,015$ ) disminuido comparado con los otros grupos y con un valor fuera del rango de referencia normal.

Los grupos de pacientes con NASH+EII y EII, por otro lado, presentan un número similar de células **CD127-** ( $p=0,048$ ), mientras que el grupo con NASH muestra un valor más disminuido. Los valores de estas células para los tres grupos están fuera del rango de referencia normal.

De los subtipos de células linfoides innatas ha resultado ser significativo el número de células **ILC2** ( $p=0,034$ ), este se encuentra más elevado en el grupo de pacientes con EII que en el resto de grupos, y con un valor que aún entra dentro del rango de referencia normal.

Por último, también ha resultado el subtipo **ILC1** como significativo ( $p=0,05$ ), donde hay notables diferencias en el número de células entre los tres grupos, teniendo el grupo con EII el valor más alto y NASH el más bajo. Ningún valor de los tres grupos entra dentro del rango de referencia normal.

En el resto de poblaciones no se ha encontrado una relación estadísticamente significativa con los tres grupos de pacientes.



**Figura 17.** Box plots comparando tres grupos de pacientes (NASH, NASH coexistente con EII y EII) con cada una de las poblaciones analizadas en el panel de citometría de células linfoides innatas (ILC): linfocitos (A), CD45+ (B), lin- (C), CD127+ (D), ILC1 (E), ILC2 (F), ILC3 (G).

#### 4.3.5 EXPRESIÓN DE IMMUNE CHECKPOINTS

No se han encontrado relaciones significativas entre las células con expresión de *immune checkpoints* y los tres grupos de pacientes, ni a día 0, ni a los 3 días tras estimulación con PHA (Figura 18 y 19).

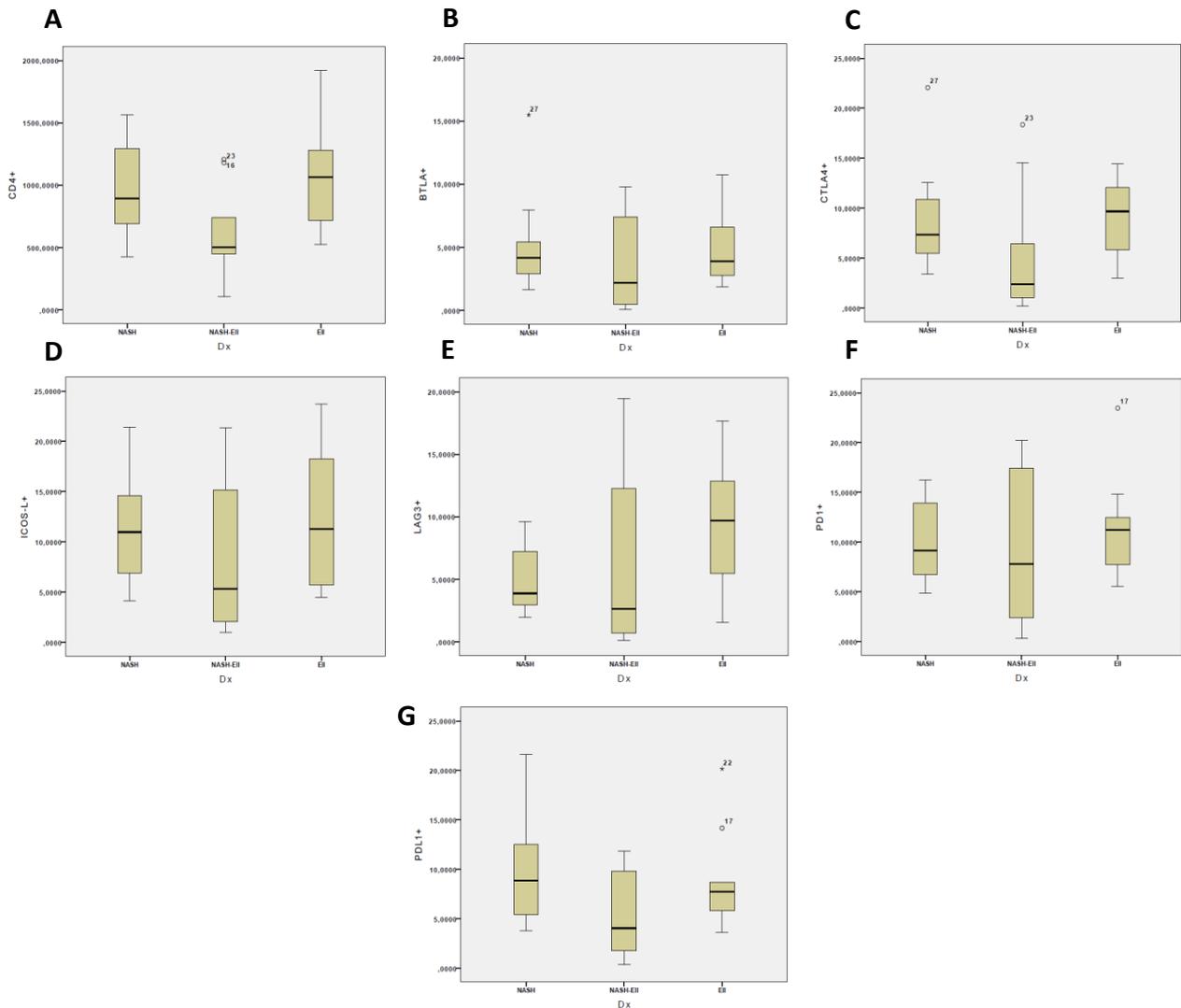
Sin embargo, se ha observado un aumento relevante de células/mm<sup>3</sup> entre el día 0 y el día 3. Esto último se ha representado en la siguiente tabla (Tabla 4) mediante la variación entre ambos días (día 3 - día 0).

% Células/mm <sup>3</sup> (Media ± DS)		BTLA+	CTLA4+	ICOS-L+	LAG3+	PD1+	PDL1+
DÍA 0	Controles	0,39 ± 0,27	1,47 ± 1,37	2,85 ± 1,63	0,23 ± 0,15	0,73 ± 0,39	1,1 ± 1,19
	NASH	0,55 ± 0,44	0,99 ± 0,44	1,24 ± 0,5	0,56 ± 0,52	1,16 ± 0,52	1,11 ± 0,55
	NASH+EII	0,42 ± 0,37	0,69 ± 0,63	1,24 ± 0,81	0,72 ± 0,62	1,34 ± 1,25	0,74 ± 0,37
	EII	0,56 ± 0,37	0,84 ± 0,32	1,12 ± 0,39	0,98 ± 0,56	1,15 ± 0,43	0,89 ± 0,47
DÍA 3	Controles	14,18 ± 8,06	19,06 ± 14,77	20,27 ± 17,72	39,84 ± 16,84	14,74 ± 9,45	57,28 ± 28,11
	NASH	24,56 ± 8,35	20,39 ± 14,93	4,03 ± 6,82	27,72 ± 14,14	13,5 ± 4,3	50,74 ± 19,72
	NASH+EII	22,31 ± 12,06	15,12 ± 12,77	14,37 ± 20,58	20,14 ± 16,56	23,86 ± 26,07	36,86 ± 20,73
	EII	21,68 ± 6,37	23,50 ± 13,62	9,9 ± 10,48	25,23 ± 11,62	22,13 ± 13,97	49,65 ± 21,91
Variación día 3 - día 0	Controles	13,79 ± 7,94	17,59 ± 14,88	17,42 ± 18,72	39,61 ± 16,81	14,01 ± 9,24	56,18 ± 28,22
	NASH	24 ± 8,11	19,4 ± 15,11	2,79 ± 6,76	27,17 ± 14,25	12,35 ± 3,94	49,63 ± 19,99
	NASH+EII	21,88 ± 11,74	14,43 ± 12,36	13,14 ± 20,27	19,43 ± 16,43	22,32 ± 25,01	36,12 ± 20,41
	EII	21,11 ± 6,16	22,66 ± 13,68	8,78 ± 10,37	24,25 ± 11,83	20,99 ± 13,80	48,77 ± 22,11
Valor de p	Análisis de Kruskal-Wallis	0,0728	0,5854	0,0599	<b>0,0542</b>	0,7426	0,2682
Valor de p	Comparaciones entre grupos	NS	NS	NS	Control VS NASH+EII p= <b>0,0445</b>	NS	NS

**Tabla 4.** Media y desviación estándar (DS) de los porcentajes de células/mm<sup>3</sup> de varios *immune checkpoints* (BTLA, CTLA, ICOS-L, LAG3, PD1 y PDL1) respecto a las células CD4+, en el día 0, día 3 y la variación correspondiente a la diferencia entre ambos días, en el grupo control y los tres grupos de pacientes (NASH, NASH+EII y EII). Significación estadística mediante el test de Kruskal-Wallis y comparaciones entre grupos.

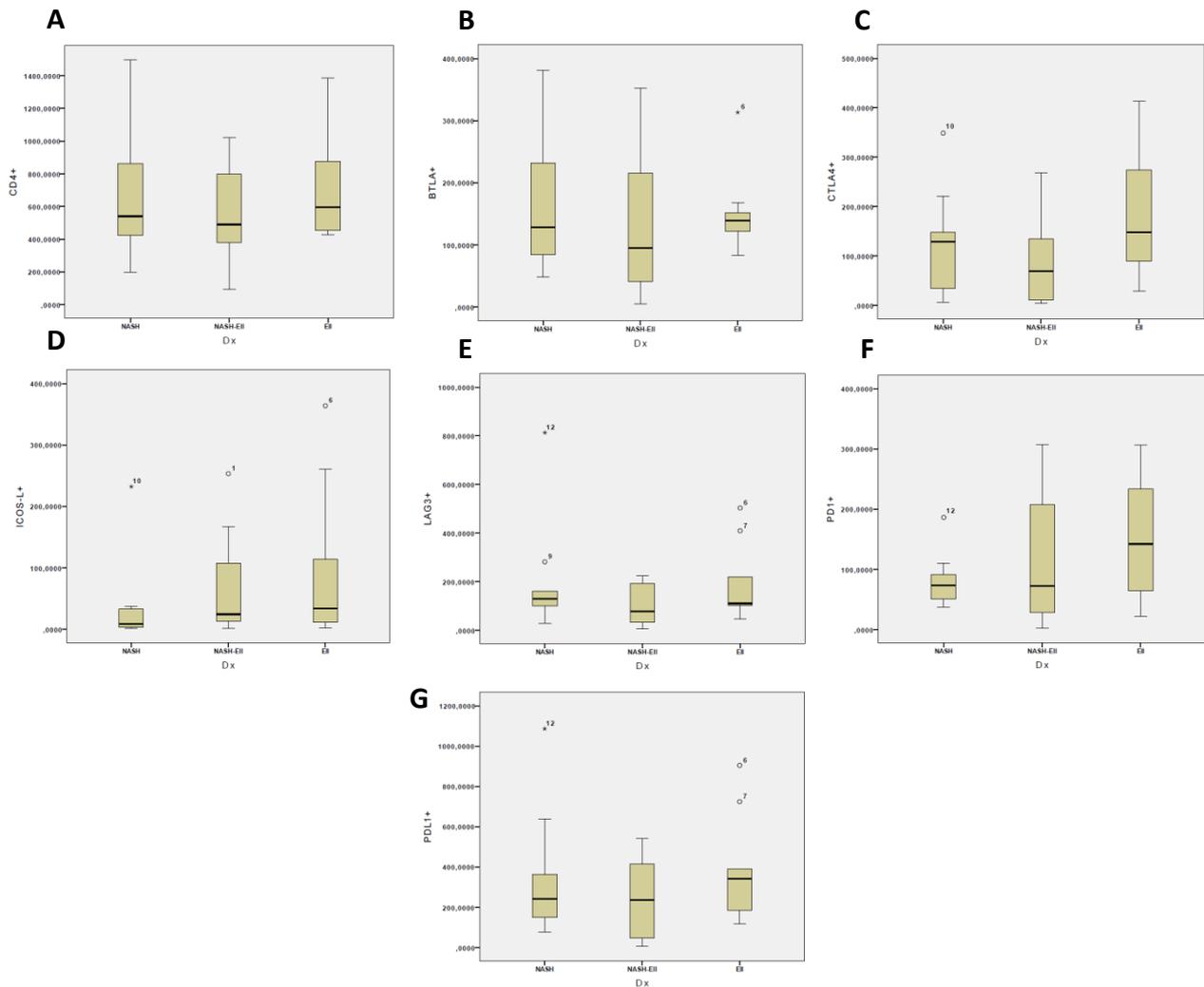
NS, no significativo

4.3.5.1 En el día 0



**Figura 18.** *Box plots* comparando tres grupos de pacientes (NASH, NASH coexistente con EII y EII) con cada una de las poblaciones analizadas en el panel de citometría de expresión de *immune checkpoints* en el día 0: CD4+ (A), BTLA+(B), CTLA-4+ (C), ICOS-L+ (D), LAG-3+ (E), PD-1+ (F), PD-L1+ (G).

### 4.3.5.2 Tras estimulación a los 3 días



**Figura 19.** Box plots comparando tres grupos de pacientes (NASH, NASH coexistente con EII y EII) con cada una de las poblaciones analizadas en el panel de citometría de expresión de *immune checkpoints* en el día 3: CD4+ (A), BTLA+ (B), CTLA-4+ (C), ICOS-L+ (D), LAG-3+ (E), PD-1+ (F), PD-L1+ (G).

## 5. DISCUSIÓN

---

Durante este trabajo se han puesto a punto diversos paneles de anticuerpos monoclonales para el marcaje y la cuantificación de diversas poblaciones celulares inmunoefectoras y reguladoras mediante citometría de flujo.

En el caso del panel de citometría de las células T *helper*, se ha incluido el marcador PD-1 debido a que algunos estudios evidencian que este *immune checkpoint* influye en el subtipo Th2 de estas células (17). Sin embargo, no se ha encontrado ninguna expresión significativa de esta molécula en los resultados. Por otro lado, en el análisis de las citocinas intracitoplasmáticas de las subpoblaciones de T *helper* no se ha conseguido mostrar el marcaje de las células IFN $\gamma$ -IL17+, IFN $\gamma$ -IL2-, IFN $\gamma$ -IL2+, IFN $\gamma$ +IL2- e IFN $\gamma$ +IL2+ de manera tan clara como en otros estudios. Ha sido más claro el marcaje empleado con moléculas de superficie propias de cada subtipo de Th, quizás por no depender de la activación policlonal *in vitro*.

Las células T CD4+ desempeñan un rol muy importante como mediadoras de la homeostasis y la inflamación en el intestino, por ello pacientes con EII suelen presentar diferentes perfiles de maduración de estas células con su correspondiente producción de citocinas en la mucosa intestinal creando el ambiente inflamatorio que presenta esta patología (18).

En este estudio han resultado significativamente alteradas, entre otras, tanto las células T CD4+ TEMRA como las T CD4+ naïve. Donde presentan un número más elevado las células **TEMRA** es en el grupo de pacientes con NASH, mientras que en el de NASH+EII tienen un nivel más bajo, siendo prácticamente inexistentes en el de EII. Aunque es un hallazgo cuantitativo, este dato sugiere que el aumento en sangre de células TEMRA se asocia sólo a la patología hepática pero protege frente al desarrollo de la EII. Por otro lado, las células **T naïve** se encuentran especialmente elevadas en el grupo de pacientes con EII, sin encontrarse una explicación clara a este hallazgo. Es decir, en la patología del NASH se ha encontrado más activación y memoria T, mientras que los pacientes con EII han presentado una activación T menor con más células naïve.

Las células **Th17** también se han encontrado significativamente elevadas en el grupo de pacientes con EII, lo que puede ser indicativo de que esta subpoblación sea una de las responsables del ambiente inflamatorio que caracteriza a esta patología debido a su producción de diversas citocinas inflamatorias, tal como está descrito previamente (19).

En cuanto a las células **Treg**, una de sus principales funciones es el mantenimiento de la tolerancia inmunológica y su ausencia se relaciona con el desarrollo de fenómenos inflamatorios. El hecho de que las células Treg (**Figura 9L**) haya mostrado una clara **disminución** en el grupo de pacientes con NASH coexistente con EII, sugiere que este grupo es el que presenta más signos de inflamación, seguido del grupo con EII y por último el de NASH. El nivel de células Treg disminuido en los pacientes con NASH+EII comparado con los otros dos grupos estaría propiciando un ambiente **pro inflamatorio** en este tipo de patologías.

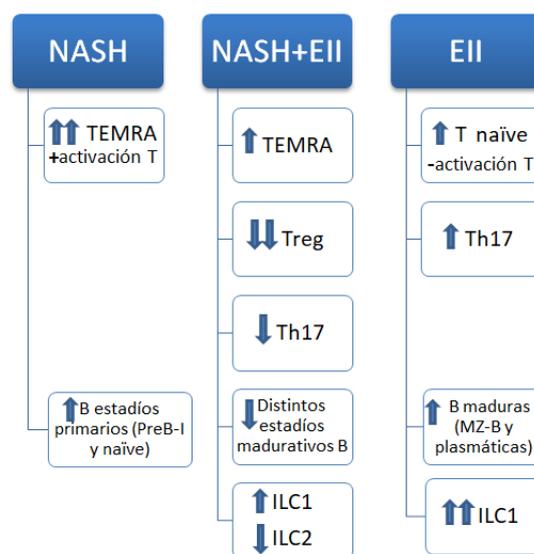
Dicho esto, teniendo en cuenta el hecho de que las Treg disminuyen, respecto a los demás grupos, en los pacientes con NASH+EII de una forma más notable que las Th17, el **ratio Treg/Th17 estaría a favor de las Th17**, con el correspondiente aumento de la producción de citocinas inflamatorias.

Los cambios en los porcentajes de células B sanguíneas en sus distintos estadios de maduración también se han encontrado significativamente alterados entre grupos. En el grupo de pacientes con NASH+EII, las células en proceso de maduración (**PreB-I**), las inmaduras o **naïve**, las células maduras **MZ-B** y las células **plasmáticas** productoras de anticuerpos, presentan un nivel particularmente disminuido en comparación con los otros grupos. Esta deficiencia de células B en el grupo de pacientes con EII que han desarrollado NASH y el hecho de que la cirrosis del NASH sea un factor de riesgo, puede suponer un hecho diferencial de los pacientes con ambas patologías. En cambio, en el grupo con EII, las células B en estadios más maduros (MZ-B y plasmáticas) están claramente aumentadas en sangre respecto a los otros dos grupos. Parece haber un gradiente entre los tres grupos: el NASH tendría un predominio de células B en estadios inmaduros mientras que la EII tendría aumento de células B en estadios maduros, mientras que los pacientes con las dos patologías tendrían todas las poblaciones disminuidas. No encontramos una posible explicación a este dato.

Por último, un grupo de células definido recientemente y de especial interés son las **células linfoides innatas (ILC)**. Las ILC presentan una morfología linfoide pero no expresan receptores de antígeno específicos, regulan funciones inmunitarias innatas y liberan citocinas específicas que ejercen funciones efectoras. Estas células suelen encontrarse en mucosas y tienen una cierta similitud con las células T *helper* (Th1, Th2 y Th17) con una dependencia parecida de sus factores de transcripción y citocinas. Se componen de tres grupos: ILC1, ILC2 e ILC3. Las **ILC1** producen, al igual que Th1, IFN- $\gamma$ ; las **ILC2** producen citocinas del tipo de Th2 como IL-4 e IL-13; y las **ILC3** otras como la IL-17, propia de las células Th17.

A pesar de que es grupo de células de reciente descripción y de las que aún se desconocen muchas propiedades funcionales y fenotípicas, gran variedad de estudios han descubierto ya muchas de sus funciones biológicas. De hecho, están muy relacionadas con la patogenia inmunológica de la EII (principalmente ILC1 e ILC3) (20). En el presente trabajo han resultado significativamente alteradas dos subpoblaciones de este tipo de células: ILC1 e ILC2. Las ILC2 pueden prevenir la inflamación evitando el síndrome metabólico y resistencia a insulina, y promueven la polarización de macrófagos de tipo M2 secretando citocinas anti-inflamatorias; mientras que las ILC1 se encuentran asociadas a procesos inflamatorios, polarizan macrófagos hacia el tipo M1 con la expresión de citocinas pro-inflamatorias y suelen presentarse elevadas en enfermedades inflamatorias intestinales como la enfermedad de Crohn (21,22). Debido a ello, las **ILC1** se encuentran en un mayor nivel en los grupos de pacientes con EII y NASH+EII que en el grupo con NASH. El hecho de que el subtipo **ILC2** esté particularmente disminuido en el grupo con NASH+EII es posible que indique una mayor inflamación en este grupo debido a que la acción de estas células está relacionada con la prevención de la misma. Curiosamente, la población equivalente a las Th17 de la respuesta innata, las ILC3, también está aumentada, aunque no significativamente, en EII, lo cual parece indicar que la respuesta inflamatoria mediada por IL-17, la cual tiene implicaciones terapéuticas, es esencial en esta enfermedad.

En la siguiente figura (**Figura 20**) se han resumido los cambios en las frecuencias de los diversos tipos celulares inmunitarios más relevantes encontrados en cada uno de los grupos de enfermedad. De esta manera, se pueden definir las principales diferencias entre los tres grupos y sus perfiles celulares inflamatorios.



**Figura 20.** Balance de los hallazgos encontrados en cada uno de los perfiles celulares inmunitarios de los tres grupos de pacientes: NASH, NASH+EII y EII.

En el grupo con **NASH** tenemos un claro nivel de activación de células T representado por las células TEMRA favoreciendo así el ambiente inflamatorio, y la presencia de células B en estadios tempranos.

El grupo con **NASH+EII** sigue teniendo una activación T relevante por medio de TEMRA, en cambio los niveles de varias subpoblaciones B en distintas fases madurativas se encuentran disminuidos. Este grupo también presenta un importante descenso en las células Treg que favorece la inflamación, y un ratio Treg/Th17 a favor de éstas últimas debido a que los niveles de Treg son claramente inferiores. Este desequilibrio del ratio conlleva la liberación de citocinas inflamatorias y, como se menciona en el apartado de la introducción, es una característica común a las dos patologías que componen este grupo. En el caso de las ILC, como han sugerido hechos como la escasez de Tregs, este grupo se caracteriza por presentar una inflamación importante que queda demostrada también por el aumento de las ILC1 (pro-inflamatorias) y la disminución de las ILC2 (anti-inflamatorias).

En cuanto al grupo con **EII**, cabe mencionar que, al contrario que la patología del NASH, tiene una menor activación T ocasionada por la presencia de las células T naïve, un ambiente inflamatorio caracterizado principalmente por el aumento de las Th17 respecto a los otros grupos, un nivel alto de células B maduras correspondiente al gradiente mencionado, y por último, un número claramente elevado de células ILC1 que apoyan el fenotipo inflamatorio característico de la EII.

## 6. CONCLUSIONES

---

- Se ha puesto a punto la técnica de citometría de flujo con diversos paneles de anticuerpos monoclonales para el marcaje y la cuantificación de diferentes poblaciones celulares inmunoefectoras y reguladoras, donde se han identificado con éxito **linfocitos T efectoras**, de **memoria**, **naïve**, **células T reguladoras** (Treg) y **subtipos de células T helper**; **linfocitos B** durante sus distintos estadios madurativos, **células mieloides supresoras** (MDSCs) y **células linfoides innatas** (ILC); así como el nivel de expresión de varios *immune checkpoints* y la diferencia del mismo a los tres días tras estimular las células con PHA.
- En los pacientes con **NASH** ha destacado una gran activación T (TEMRA) y un aumento de células B en estadios inmaduros.
- La **EII** ha presentado una activación T disminuida (T naïve) con un ambiente claramente inflamatorio definido por Th17 e ILC1, y un aumento de células B en estadios maduros (células B memoria y plasmáticas).
- La coexistencia de ambas patologías en el grupo con **NASH+EII** ha presenciado una activación T como en el NASH, un ambiente inflamatorio marcado (disminución ratio Treg/Th17, aumento ILC1, descenso ILC2) y un descenso generalizado de las poblaciones de células B estudiadas.

## REFERENCIAS

---

1. Kuek A, Hazleman BL, Östör AJK. Immune-mediated inflammatory diseases (IMIDs) and biologic therapy: a medical revolution. *Postgraduate Medical Journal* [revista en Internet] 2007 abril; 83(978): [251-260]. <http://dx.doi.org/10.1136/pgmj.2006.052688>
2. Schett G, Elewaut D, McInnes IB, Dayer JM, Neurath MF. How cytokine networks fuel inflammation: Toward a cytokine-based disease taxonomy. *Nature Medicine* [revista en Internet] 2013 julio; 19 (7): [822-824]. <https://doi.org/10.1038/nm.3260>
3. Abedini R, Salehi M, Lajevardi V, Beygi S. Patients with psoriasis are at a higher risk of developing nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical and Experimental Dermatology* [revista en Internet] 2015 octubre; 40 (7): [722-727]. <https://doi.org/10.1111/ced.12672>
4. Van Herck, MA, Weyler J, J. Kwanten W et al.. The Differential Roles of T Cells in Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Obesity. *Frontiers in Immunology* [revista en Internet] 2019 febrero; 10 (82): [20]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00082>
5. Sartini A et al. Non-alcoholic fatty liver disease phenotypes in patients with inflammatory bowel disease. *Cell Death & Disease* [revista en Internet] 2018 enero; 9 (87): [8]. <https://dx.doi.org/10.1038%2Fs41419-017-0124-2>
6. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* [revista en Internet] 2010 septiembre; 52 (5): [1836-1846]. <https://doi.org/10.1002/hep.24001>
7. Geurts L et al. Gut microbiota controls adipose tissue expansion, gut barrier and glucose metabolism: novel insights into molecular targets and interventions using prebiotics. *Beneficial Microbes* [revista en Internet] 2014 marzo; 5(1): [3-17]. <https://doi.org/10.3920/BM2012.0065>
8. Crespo J, Cayon A, Fernández-Gil P, et al. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* [revista en Internet] 2001 diciembre; 34 (6): [1158-1163]. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.29628>
9. He B et al. The imbalance of Th17/Treg cells is involved in the progression of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *BMC Immunology* [revista en Internet] 2017; 18 (33): [9]. <https://doi.org/10.1186/s12865-017-0215-y>
10. Teml A, Schwab M, Hommes D, et al. A systematic survey evaluating 6-thioguanine-related hepatotoxicity in patients with inflammatory bowel disease. *Wien Klinische Wochenschrift* [revista en Internet] 2007 septiembre; 119 (17-18): [519-526]. <https://doi.org/10.1007/s00508-007-0841-0>

11. Baraibar I, Melero I, Ponz-Sarvisé M, Castanon M. Safety and Tolerability of Immune Checkpoint Inhibitors (PD-1 and PD-L1) in cáncer. *Drug Safety* [revista en Internet] 2019 febrero; 42 (2): [281-294]. <https://doi.org/10.1007/s40264-018-0774-8>
12. Baumeister SH, Freeman GJ, Dranoff G, Sharpe AH. Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer. *Annual Review of Immunology* [revista en Internet]. 2016 mayo; 34(1): [539–73]. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112049>
13. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* [revista en Internet] 2012 marzo; 12 (4): [252–64]. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>
14. Chowdhury PS, Chamoto K, Honjo T. Combination therapy strategies for improving PD-1 blockade efficacy: a new era in cancer immunotherapy. *Journal of Internal Medicine* [revista en Internet] 2017 Octubre; 283 (2): [110-120]. <https://doi.org/10.1111/joim.12708>
15. Wei SC, Duffy CR, Allison JP. Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy. *Cancer Discovery* [revista de Internet]; 2018 septiembre; 8 (9): [1069–1086]. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0367>
16. Prieto Martín A, Barbarroja Escuderoa J, García Torrijos C, Monserrat Sanza J. Linfocitos B. *Medicine* [revista en Internet] 2013 marzo; 11(28): [1710-1719]. <https://www.researchgate.net/publication/257150724>
17. Zhou S, Jin X, Li Y, Li W, Chen X, Xu L, Zhu J, Xu Z, Zhang Y, Liu F, Chuan Su. Blockade of PD-1 Signaling Enhances Th2 Cell Responses and Aggravates Liver Immunopathology in Mice with Schistosomiasis japonica. *PLOS Neglected Tropical Diseases* [revista en Internet] 2016 octubre; 10(10): [21]. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005094>
18. Shale M, Schiering C, Powrie F. CD4<sup>+</sup> T-cell subsets in intestinal inflammation. *Immunological Reviews* [revista en Internet] 2013 febrero; 252(1): [164–182]. <https://doi.org/10.1111/imr.12039>
19. Gálvez J. Role of Th17 cells in the pathogenesis of human IBD. *ISRN Inflamm* [revista en Internet] 2014, marzo; 2014(928461): [14]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4005031/>
20. Kim J, Kim G, Min H. Pathological and therapeutic roles of innate lymphoid cells in diverse diseases. *Archives of Pharmacal Research* [revista en Internet] 2017 noviembre; 40(11): [1249-1264]. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12272-017-0974-2>

21. Forkel M, Van Tol S, Höög C, Michaëlsson J, Almer S, Mjösberg J. Distinct Alterations in the Composition of Mucosal Innate Lymphoid Cells in Newly Diagnosed and Established Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Journal of Crohn's and Colitis* [revista en Internet] 2019 enero; 13 (1): [67–78]. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jiy119>
22. Saetang J, Sangkhathat S. Role of innate lymphoid cells in obesity and metabolic disease (Review). *Molecular Medicine Reports* [revista en Internet] 2018 enero; 17(1): [1403–1412]. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8038>

## ANEXO

El anexo aporta los valores numéricos, correspondientes a las figuras del apartado 5.3 de resultados, de la mediana (med), rango (R) y amplitud intercuartílica (IQR) de los tres grupos de pacientes (NASH, NASH coexistente con EII y EII) comparados con cada una de las poblaciones analizadas en los paneles de citometría de este estudio.

**Tabla 5. Linfocitos T efectores, memoria y naïve (Figura 11)**

	NASH			NASH+EII			EII		
	Med	R	IQR	Med	R	IQR	Med	R	IQR
<b>CD4+</b>	896,7	1374,67	727,23	694,88	867,37	334,35	1162,51	1648,92	980,77
<b>CD8+</b>	535,68	900,24	522,96	366,84	1371,91	405,37	354,51	887,41	298,99
<b>CD4-CM</b>	337,26	692,26	441,27	224,54	293,56	160,63	334,74	1106,73	301,04
<b>CD4-EM</b>	132,9	239,61	57,44	112	289,38	101,77	87,96	281,9	130,55
<b>CD4-Naive</b>	416,49	723,75	326,09	280,39	580,71	175,48	535,47	929,28	444,32
<b>CD4-TEMRA</b>	9,42	60,38	19,65	4,71	22,31	12,81	1,65	7,9	1,76
<b>CD8-CM</b>	51,08	66,16	41,84	39,45	86,7	26,09	46,06	287,57	35,36
<b>CD8-EM</b>	65,39	405,63	132,98	39	254,62	138,25	48,31	251,49	139,4
<b>CD8-Naive</b>	159,3	461,54	76,74	119,5	281,49	163,86	232,41	330,66	201,82
<b>CD8-TEMRA</b>	190,57	691,32	268,31	85,44	1004,44	308,43	43,86	98,08	70,35
<b>TREG</b>	30,93	63,93	27,91	14,48	45,49	14,94	24,9	67,36	15,41

**Tabla 6. Células T reguladoras FoxP3+ (Figura 12)**

		NASH			NASH+EII			EII		
		Med	R	IQR	Med	R	IQR	Med	R	IQR
<b>TREG</b>	<b>CD4+</b>	891,62	956,62	533,46	659,46	1195,79	505,61	1089,55	1446,15	768,05
	<b>TREG</b>	49,63	53,23	31,4	41,7	77,45	22,01	45	84,71	42,02

**Tabla 7. Células T helper (Figura 13)**

		NASH			NASH+EII			EII		
		Med	R	IQR	Med	R	IQR	Med	R	IQR
<b>THELPER</b>	<b>B Foliculares</b>	42,37	404,47	229,46	0	211,77	56,59	64,37	165,54	105,5
	<b>CD19+</b>	47,11	413,78	240,84	0	217,75	65,89	72,27	174,56	119,28
	<b>CD4+</b>	861,18	1185,39	604,47	471,98	1218,59	660,19	1099,92	1330,9	740,17
	<b>CD45+</b>	2274,06	2340,1	1161,81	970,91	2102,21	1452,7	1916,99	2528,93	986,21
	<b>Th1</b>	163,61	503,84	245,84	132,23	316,7	154,28	128,61	250,26	179,67
	<b>Th17</b>	70,47	163,47	70,69	30,44	153,87	66,48	103,18	350,22	67,54
	<b>Th2 (CD294+)</b>	10,27	15,02	7,76	6,78	16,45	8,33	6,8	13,48	5,47

**Tabla 8. Citocinas intracitoplasmáticas de las subpoblaciones de T helper (Figura 14)**

		NASH			NASH+EII			EII		
		Med	R	IQR	Med	R	IQR	Med	R	IQR
<b>CITOCINAS</b>	<b>CD4+</b>	965,26	1102,04	574,72	605,1	1020,43	471,09	965	1410,67	872,9
	<b>IFN-G- IL-17+</b>	3,61	17,86	6,7	7,38	29,39	14,98	5,3	18,25	10,89
	<b>IFN-G- IL-2-</b>	949,31	1096,57	554,84	568,95	1015,48	485,56	889,98	1387,29	875,3
	<b>IFN-G- IL-2+</b>	7,73	17,42	4,39	6,19	11,93	8,97	5,31	50,45	17,11
	<b>IFN-G+ IL-2-</b>	17,7	18,28	10,89	12,29	19,66	12,94	10,03	47,26	13,03
	<b>IFN-G+ IL-2+</b>	1,53	3,37	2,21	1,03	8,2	1,37	0,99	3,99	1,44

**Tabla 9. Linfocitos B (Figura 15)**

		NASH			NASH+EII			EII		
		Med	R	IQR	Med	R	IQR	Med	R	IQR
<b>LB</b>	<b>CD19+</b>	234	381	254	116	503	101	184	447	249
	<b>B Foliculares</b>	31,53	109,35	49,92	13,4	58,48	37,03	24,85	110,2	46,33
	<b>IMMAT</b>	0,29	2,02	0,55	0,26	0,56	0,36	0,33	0,69	0,56
	<b>MZ-B</b>	4,74	14,82	5,28	2,1	27,52	11,33	17,25	47,8	27,44
	<b>Naïve</b>	12,04	25,68	17,19	1,85	18,31	3,63	3,33	30,33	18,25
	<b>Plasmáticas</b>	35,23	41,22	21,41	24,11	73,43	26,24	68,89	108,79	48,35
	<b>PreB-I</b>	1,64	2,55	1,91	0,36	0,94	0,37	0,82	4,04	1,04
	<b>PreB-II</b>	43,09	94,82	65,25	11,26	66,62	40,35	29,33	106,92	60,38
	<b>T1</b>	0	0,42	0,1	0	1,4	0,3	0,06	0,32	0,22
	<b>T2</b>	6,07	82,1	34,85	1,44	18,80	9,5	5,96	62,23	14,3
<b>T3-T3'</b>	6,03	9,98	7,26	1,59	3,69	2	1,95	11,79	8,17	

**Tabla 10. Células mieloides supresoras (MDSCs) (Figura 16)**

	NASH			NASH+EII			EII			
	Med	R	IQR	Med	R	IQR	Med	R	IQR	
<b>MDSCs</b>	<b>CD33+DR-</b>	166,98	373,87	117,56	50,56	313,56	121,78	71,17	291,77	210,24
	<b>CD33+DR-CD14+</b>	12,04	21,92	13,47	9,01	44,84	17,37	8,78	73,78	40,15
	<b>Lin-CD33+DR-DN</b>	5,7	19,03	2,88	1,76	15,76	6,96	4,65	16,1	13,42
	<b>CD33+DR-CD15+</b>	24,68	257,21	71,24	22,52	220,83	92,84	32,45	205,19	129,9
	<b>CD33+DR-CD14+CD11b+CD124+</b>	10,74	14,81	10,56	7,79	44,15	17,94	8,13	68,19	35,08
	<b>CD33+DR-CD15+CD11b+CD124+</b>	21,95	198,86	53,62	21,36	217,99	89,9	24,48	201,72	110,73
	<b>Lin-CD33+DR-DN CD124+</b>	4,07	12,4	2,25	1,32	15,01	6,83	2,06	13,71	12,41

**Tabla 11. Células linfoides innatas (ILC) (Figura 17)**

	NASH			NASH+EII			EII			
	Med	R	IQR	Med	R	IQR	Med	R	IQR	
<b>ILC</b>	<b>127+</b>	2,07	6,53	1,89	4,32	5,41	4,1	4,07	8,32	4,72
	<b>CD45+</b>	2324,29	2490,35	1036,14	879,69	1988,1	1465,65	1947,36	2531,24	996,33
	<b>ILC1</b>	1,05	3,89	0,9	1,91	4,87	3,29	2,62	5,07	2,24
	<b>ILC2</b>	0,71	1,45	0,44	0,42	2,03	1,14	1,69	2,25	1,47
	<b>ILC3</b>	0,39	1,39	0,55	0,35	1,02	0,58	0,67	2,3	0,98
	<b>LIN-</b>	36,25	50,3	30,54	14,3	50,94	18,7	22,86	48,11	16,92

Tabla 12. *Immune checkpoints* (Figuras 18 y 19)

IMMUNE CHECKPOINTS			NASH			NASH+EII			EII		
			Med	R	IQR	Med	R	IQR	Med	R	IQR
			DÍA 0	<b>BTLA+</b>	4,16	13,85	3,46	2,17	9,76	7,84	3,89
<b>CD4+</b>	893,68	1138,27	645,82	502,44	1100,87	579,4	1064,22	1392,4	752,4		
<b>CTLA4+</b>	7,35	18,64	5,8	2,41	18,14	9,54	9,67	11,43	7,82		
<b>ICOS-L+</b>	10,96	17,31	8,76	5,3	20,33	16,62	11,28	19,2	13,37		
<b>LAG3+</b>	3,87	7,66	4,75	2,64	19,32	12,41	9,69	16,09	8,05		
<b>PD1+</b>	9,16	11,33	7,7	7,78	19,88	15,78	11,21	17,95	6,38		
<b>PDL1+</b>	8,86	17,84	8,04	4,05	11,47	8,77	7,72	16,56	5,91		
DÍA 3	<b>BTLA+</b>	128,46	332,45	166,35	94,7	346,68	238,7	139,07	230,28	52,05	
<b>CD4+</b>	539,9	1299,04	519,69	489,76	925,74	553,87	595,91	957,56	506,69		
<b>CTLA4+</b>	128,63	342,4	138,77	69,43	265,36	161,34	148,18	384,87	218,29		
<b>ICOS-L+</b>	8,76	230,73	31,53	24,3	252,07	125,68	33,62	361,43	179,62		
<b>LAG3+</b>	128,74	784,81	90,24	78,13	218,9	174,07	110,6	458,01	219,52		
<b>PD1+</b>	73,23	148,65	47,17	72,52	305,58	210,91	142,33	284,34	216,69		
<b>PDL1+</b>	241,57	1009,6	292,53	236,84	534,94	408,37	341,7	787,9	399,06		