

Células reguladoras del donante en el control de la respuesta alrogénica. Posibles implicaciones para el desarrollo de terapias en autoinmunidad.

Margarita Velásquez,^{1,2} Luis Alfonso Correa,² Andrés Jaramillo,³ Luis F García.¹

Universidad de Antioquia.

1. Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, GICIG.
2. Grupo de Investigación Dermatológica, GRID.
3. Gift of Hope Organ & Tissue Donor Network.

Resultados parciales fueron presentados en el congreso de la Asociación Colombiana de Alergia, Asma e Inmunología, ACAAI 2005 (resultados preliminares y parciales de la fenotipificación de las células dendríticas en bazo humano). En congresos internacionales: ASHI (American Society of Histocompatibility and Immunogenetics), primer simposio internacional de Inmunomodulación, Universidad de Antioquia, Medellín, 2007. Resultados publicados en revistas internacionales: *Transplant Immunology* 2008; 19:127-35, aceptados para publicación en *Clin and Exp Immunol*.

Introducción

Uno de los principales objetivos de investigación en inmunología es la comprensión y modulación de los mecanismos de tolerancia tanto a autoantígenos como a aloantígenos. En trasplantes, la inducción y mantenimiento de la tolerancia han sido logrados exitosamente en algunos modelos animales, a través de diferentes protocolos que permiten la deleción central y periférica de las clonas alorreactivas, la inducción de muerte celular inducida por activación (AICD), la anergia, la desviación inmune y la generación de células T reguladoras en el receptor. En humanos se han descrito protocolos usando anticuerpos monoclonales anti-CD4 no depuradores y transfusiones sanguíneas o infusiones de médula ósea del donante, que permiten la inducción de tolerancia parcial y el uso de dosis menores de fármacos inmunomoduladores. Por otro lado, en autoinmunidad la terapéutica ha sido enfocada especialmente al uso de terapias inmunosupresoras e inmunomoduladoras, las cuales no están exentas de los riesgos generados por la inmunosupresión como el desarrollo de infecciones, cáncer y complicaciones metabólicas. La posibilidad de que las células T reguladoras del donante modulen la alorreactividad en el receptor y favorezcan el desarrollo de tolerancia en el contexto de trasplante de órganos sólidos ha sido escasamente evaluada.

Materiales y métodos

HIPÓTESIS: Las células reguladoras del donante son ca-

paces de inhibir las células efectoras alorreactivas del receptor y favorecer el desarrollo de tolerancia a los antígenos del injerto.

MODELO MURINO *IN VITRO*: Cultivos de células CD4⁺CD25⁻ estimuladas con células dendríticas alogénicas CD11c⁺ en presencia de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ singénicas, derivadas del estimulador o de un tercero, seleccionadas con columnas magnéticas. Con el fin de determinar el efecto regulador en diferentes acervos genéticos, fueron realizados experimentos independientes con células respondedoras CD4⁺CD25⁻ C57BL/6 (H2^b), BALB/c (H2^d) y C3H (H2^k). Después de 48h, el número de células alorreactivas IFN- γ + fue evaluado por ELISPOT.

MODELO MURINO *IN VIVO*: Aloinjertos de piel en ratones BALB/c nu/nu reconstituidos con células T CD4⁺CD25⁻ BALB/c, en presencia o ausencia de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ singénicas (BALB/c), derivadas del donante (C57BL/6) o de un tercero (C3H). Los injertos fueron inspeccionados clínicamente hasta 80 días postrasplante y se realizó evaluación histopatológica de los aloinjertos con el fin de determinar la presencia o ausencia de signos de rechazo. Con el fin de evaluar el establecimiento de tolerancia a los aloantígenos, los esplenocitos de los ratones tratados en el modelo in vivo fueron colectados en el momento del rechazo o al día 80 postrasplante y cultivados con células dendríticas singénicas (BALB/C), del donante (C57BL/6) o de un tercero (C3H). Después de 48h, el número de células alorreactivas IFN- γ + fue evaluado por ELISPOT.

MODELO HUMANO *IN VITRO*: Cultivos con células T reguladoras CD4⁺CD25^{high} seleccionadas por citometría de flujo de tres voluntarios sanos, previa tipificación del HLA. Después de 48h, el número de células alorreactivas IFN- γ + fue evaluado por ELISPOT. Para evaluar la posible utilidad del bazo humano como fuente de células para el desarrollo de terapias celulares para inducción de tolerancia, se realizó la fenotipificación por citometría de flujo e inmunohistoquímica de las subpoblaciones de

linfocitos reguladores CD4⁺FOXP3⁺, CD4⁺CD25^{high}, CD8⁺FOXP3⁺, CD8⁺CD28⁻ y células dendríticas (DC) convencionales o mieloides (cDC) y plasmocitoides (pDC) de bazo de donantes fallecidos.

Resultados

Los resultados demostraron que las células T reguladoras (Treg) CD4⁺CD25⁺ murinas y CD4⁺CD25^{high} humanas del donante son capaces de inhibir las células T alorreactivas CD4⁺CD25⁻ y CD8⁺, mientras que las Treg de un tercero que no comparte ninguno de los antígenos de histocompatibilidad no inhiben la alorreactividad. En los experimentos con células humanas se observó que las células T reguladoras CD4⁺CD25^{high} de un tercero, haploidentico con las células respondedoras, inhiben de igual forma la alorreactividad, ampliando el número de posibles individuos que podrían ser fuente de células reguladoras para desarrollar terapias celulares para un determinado receptor. En cultivos de células murinas se demostró que la acción de las células reguladoras del donante es dependiente de IL-10 y TGF- β y reversible con IL-2. La piel, debido a la presencia de células de Langerhans y otras células presentadoras de antígenos (APC), es uno de los modelos de trasplante de órgano sólido con mayor tendencia al rechazo y más exigentes para la inducción de tolerancia. Los resultados demostraron que las Treg del donante, al igual que las Treg singénicas, mejoraron la supervivencia de los injertos de piel e indujeron tolerancia específica a los antígenos del donante.

En el bazo humano los estudios de citometría de flujo demostraron la presencia de células T reguladoras, especialmente células CD8⁺CD28⁻ (11.5% \pm 8.1) y en menor frecuencia, células CD4⁺FOXP3⁺ y CD4⁺CD25^{high} (1.1% \pm 0.5 y 0.2% \pm 0.2, respectivamente). En los estudios de inmunohistoquímica los resultados muestran la presencia de escasas células FOXP3⁺, localizadas en los folículos linfoides B y en la zona periarteriolar de linfocitos T. Las DC fueron evaluadas por citometría de flujo con tres tipos de marcadores. De acuerdo con la expresión de CD11c y CD123 se estudiaron los fenotipos CD11c^{high}HLA-DR⁺CD123^{-/low} (cDC) y CD11c^{-/low}HLA-DR⁺CD123^{high} (pDC); la expresión de HLA-DR y CD11c o CD123 en células que no expresan marcadores de linaje, LIN⁻HLA-DR⁺CD11c⁺ (cDC) y LIN⁻HLA-DR⁺CD123⁺ (pDC); y marcadores relacionados con células dendríticas de sangre periférica, BDCA⁻¹, BDCA⁻³, para cDC, y BDCA⁻² y BDCA⁻⁴ para pDC. En las cDC se evaluó el marcador de maduración CD83. Los resultados demuestran la presencia de células cDC y pDC de los diferentes fenotipos evaluados, siendo más frecuentes las cDC CD11c^{high}HLA-DR⁺CD123^{-/low} (2.3% \pm 0.9); las cDC inmaduras y maduras estuvieron presentes en 1.0%

\pm 1.6% y 1.5 \pm 0.8, respectivamente.

Las pDC CD11c^{-/low}HLA-DR⁺CD123^{high} se observaron en 0.3% \pm 0.25 y LIN⁻HLA-DR⁺CD123^{high} en 0.3% \pm 0.1. Por inmunohistoquímica se observaron células CD11c⁺, CD123⁺ y CD83⁺ en la zona subcapsular, el área de células T y los folículos de células B.

Conclusiones

Los resultados validaron la hipótesis propuesta y abren la posibilidad de utilizar células T reguladoras del donante para manipular la respuesta del receptor y favorecer la inducción de tolerancia.

El conocimiento generado en este trabajo podría ser de utilidad para el desarrollo de nuevos estudios sobre expansión y preactivación de las células reguladoras del donante y potencialmente contribuir al desarrollo de protocolos de terapias celulares de inducción y mantenimiento de tolerancia a trasplantes y autoinmunidad en el contexto clínico.

Los estudios en el bazo humano muestran la presencia de células con fenotipo regulador, tanto linfocitos como cDC inmaduras y pDC, y podrían abrir la posibilidad de usar el bazo de los donantes de órganos como fuente de células para el diseño de terapias de inducción de tolerancia en trasplantes y autoinmunidad.

Referencias

1. Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune response. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22: 531-62.
2. Cortesini NS, Colovai AI, Manavalan JS, Galluzzo S, Naiyer AJ, Liu J. Role of regulatory and suppressor T-cells in the induction of ILT3⁺ ILT4⁺ tolerogenic endothelial cells in organ allografts. *Transpl Immunol.* 2004;13: 73-82.
3. Hayday A, Tigelaar R. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3: 233-42.
4. Jiang H, Chess L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest.* 2004;114:1198-208.
5. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3: 253-7.
6. Fehervari Z, Sakaguchi SJ. CD4⁺ Tregs and immune control. *J Clin Invest.* 2004;114:1209-17.
7. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3:199-210
8. Adeegbe D, Bayer AL, Levy RB, Malek TR. Cutting edge: allogeneic CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T regulatory cells suppress autoimmunity while establishing transplantation tolerance. *J Immunol.* 2006;176: 7149-53.
9. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21: 685-711.
10. Lu L, Thomson AW. Manipulation of dendritic cells for tolerance induction in transplantation and autoimmune disease. *Transplantation.* 2002;73(1 Suppl):S19-22.