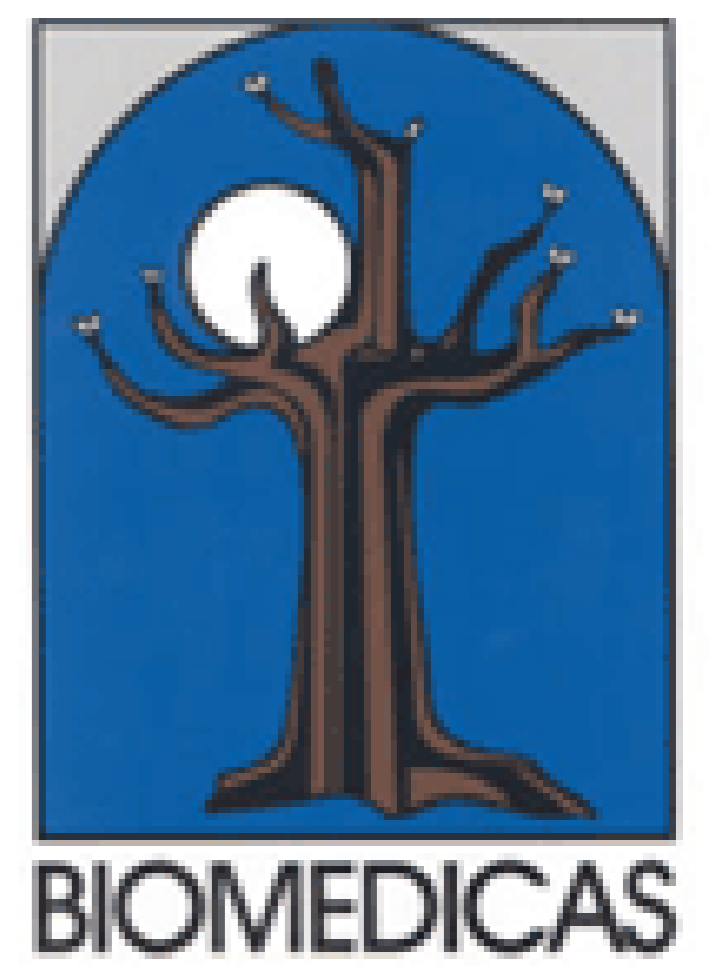




Empleo de agentes modificadores epigenéticos en la generación de Células T reguladoras CD4+CD25+FOXP3+ inducidas estables



Alvarez-Salazar EK¹, Cortés-Hernández A¹, Arteaga-Cruz Saul¹, Saint Martin Abril¹, Alberú-Gómez J² y Soldevila-Melgarejo G¹.
¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. ²Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnológico de Monterrey.
 Correspondencia: evelyn.alvarez@iibiomedicas.unam.mx

INTRODUCCIÓN

Las células T reguladoras (Tregs) son un subtipo de linfocitos T CD4+ que presentan un papel crucial en el mantenimiento de la tolerancia inmune. En ese sentido, es crucial el desarrollo de metodologías que permitan su expansión a gran escala para ser utilizados en la inmunoterapia para el restablecimiento de la tolerancia hacia los órganos propios, o hacia los tejidos u órganos injertados.

La mayoría de las metodologías están condicionadas a la expansión de Tregs pre-existentes; no obstante la generación de Tregs inducidas a partir de células T naive demostraron ser más estables y funcionales en condiciones de inflamación, sugiriendo una gran ventaja en tratar enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Sin embargo, uno de los principales obstáculos para el uso de las iTregs es su inestabilidad, por esta razón es necesario desarrollar estrategias para convertir células Tregs inducidas inestables a estables.

OBJETIVO

Generar y expandir Tregs *in vitro* específicas al antígeno del donante, con fenotipo y función supresora estable en presencia de citocinas proinflamatorias.

METODOLOGÍA

Se derivaron células dendritas a partir de monocitos sanguíneos que fueron cocultivados con células T "naive" entre diferentes individuos. Después de 7 días de cocultivo, se separaron las células CD25^{hi} proliferantes (iTregs aloespecíficas), se procedió a expandirlas durante 6 semanas y se evaluó su fenotipo, supresión y medición de citocinas en los sobrenadantes. Por último, se secuenció la región desmetilada específica de Tregs (TSDR) del gen FOXP3 de las CD4⁺CD25^{hi} proliferantes para evaluar el patrón de metilación del TSDR. Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba no paramétrica Mann-Whitney.

RESULTADOS

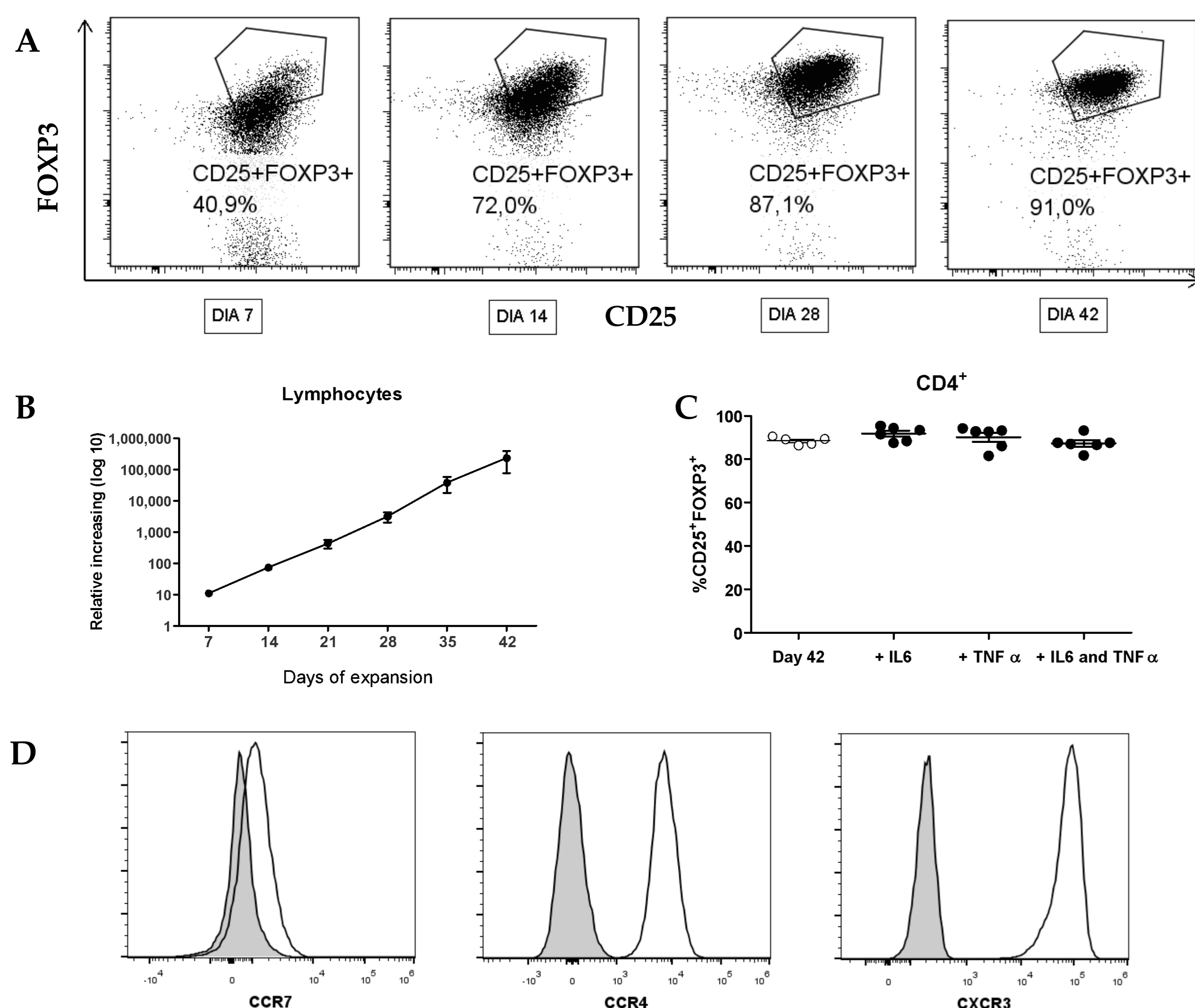


Figura 1. Células iTregs aloespecíficas expandidas por 6 semanas mantienen su fenotipo y expresión de CD25 y FOXP3 (A), alcanzando durante la 6ta semana de expansión un incremento relativo de 232 mil veces el número inicial de células en cultivo (B). No se encontraron diferencias en cuanto a la frecuencia y expresión de CD25 y FOXP3 en presencia de citocinas proinflamatorias (C), y las células expandidas expresan receptores para quimiocinas relacionadas a la migración hacia tejidos inflamados (D).

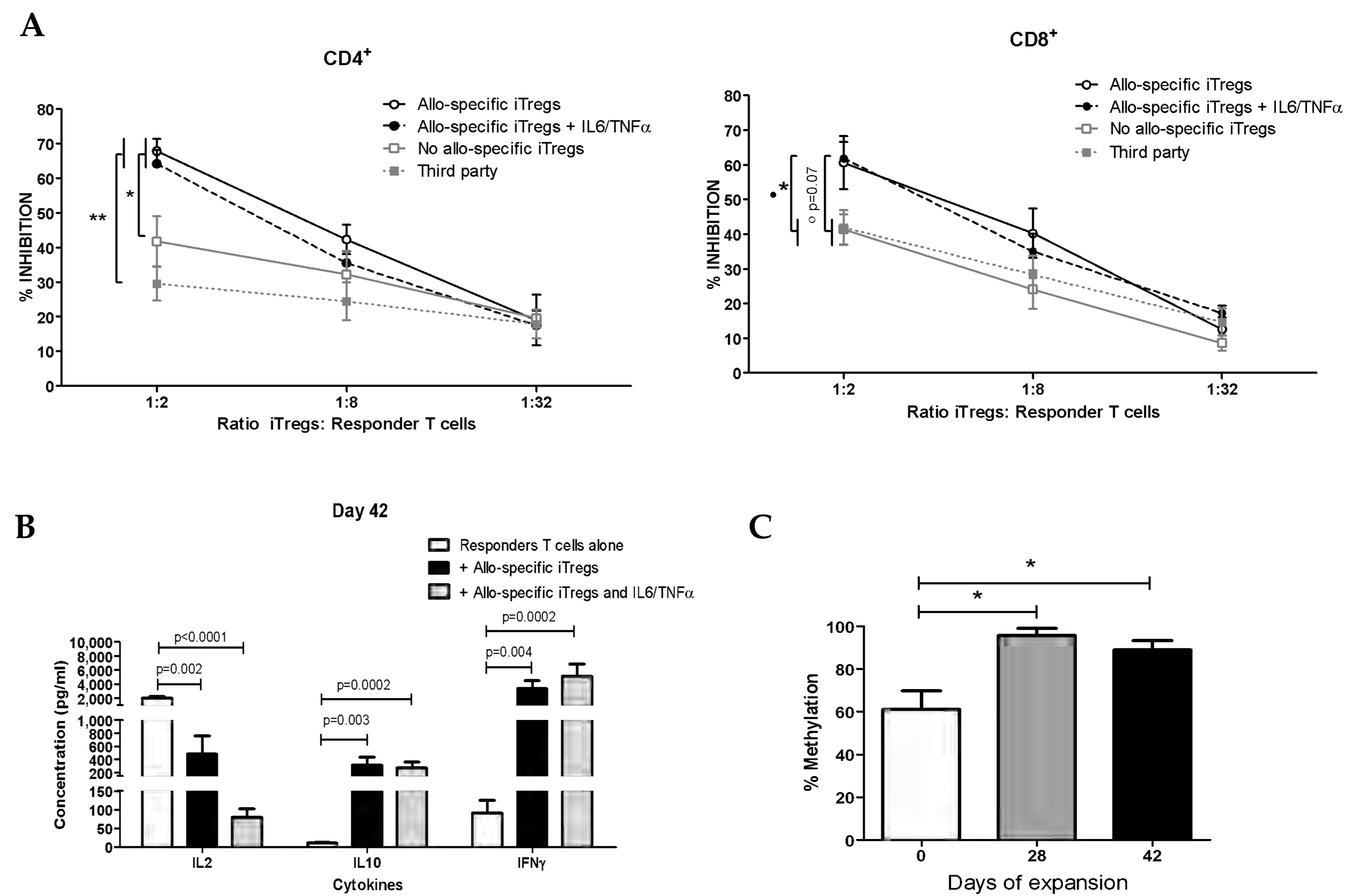


Figura 2. Las iTregs expandidas durante 6 semanas presentan una supresión antígeno-específica que no se encuentra afectada en presencia de citocinas proinflamatorias (A), y son capaces de modular la producción de IL2, IL10 e IFN γ para la supresión de la proliferación de las células T respondedoras (B). Las células iTregs recientemente convertidas muestran una desmetilación parcial del gen TSDR FOXP3, que es reducida cuando las células son expandidas policlonalmente durante 4 y 6 semanas (C).

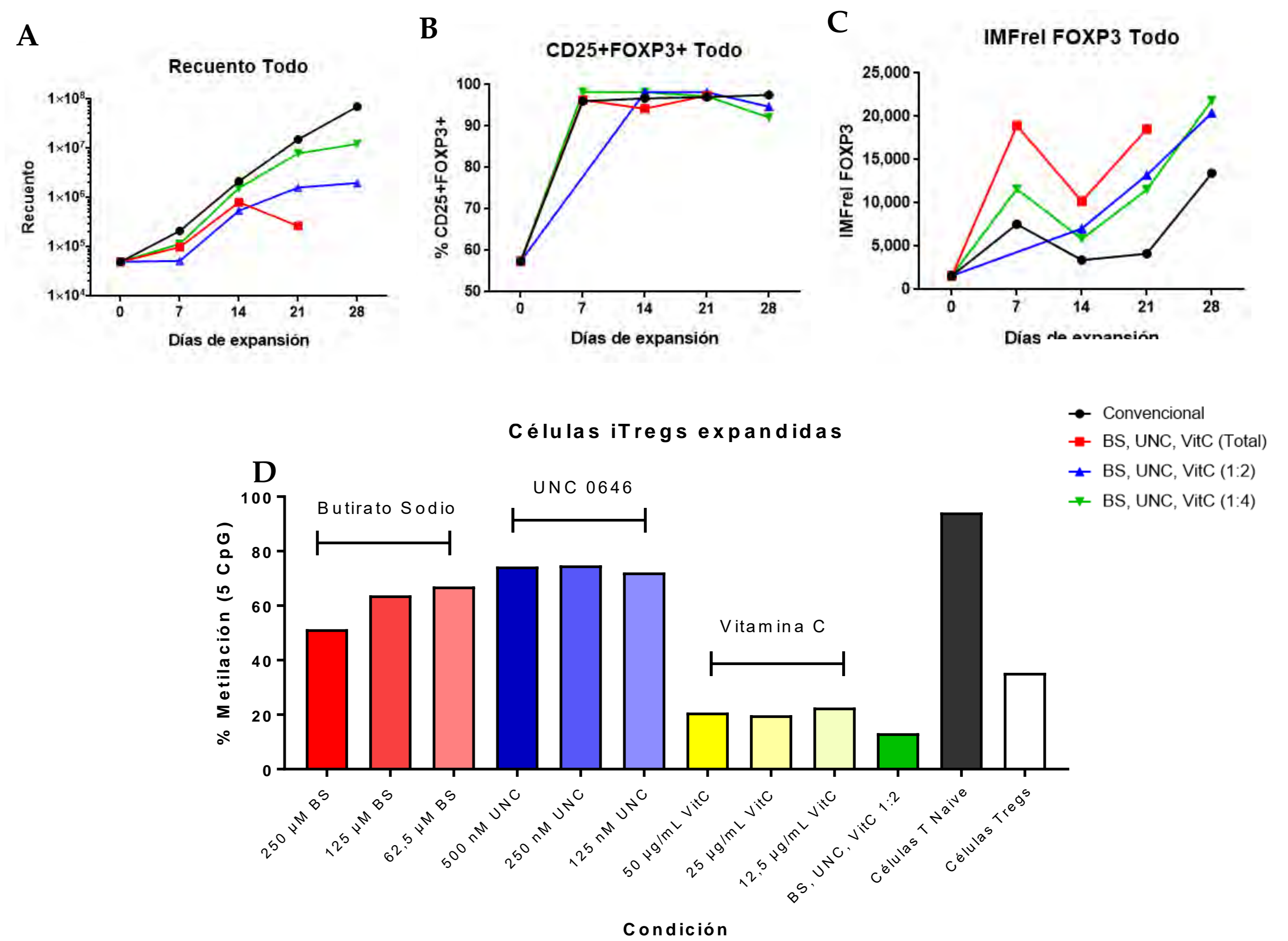


Figura 3. Efecto de los modificadores epigenéticos Butirato de sodio, UNC 0646 y Vitamina C en la expansión de Tregs inducidas *in vitro* sobre la proliferación (A) fenotipo CD25+FOXP3+ (B), expansión de FOXP3 (C) y % de metilación en el gen TSDR FOXP3 (D)

CONCLUSIONES

- Se desarrolló una metodología idónea donde se lograron generar y expandir en grandes números células T reguladoras aloespecíficas con fenotipo y función supresora estable en condiciones de inflamación.
- Las células iTregs expandidas mostraron poca desmetilación del gen TSDR FOXP3, sin embargo ésta se muestra incrementada en presencia de modificadores epigenéticos, que puede estar relacionada con la estabilidad de las células expandidas.