

Generación y expansión *in vitro* de linfocitos Tr1 aloespecíficos con potencial terapéutico para la inducción de tolerancia en pacientes con trasplante renal

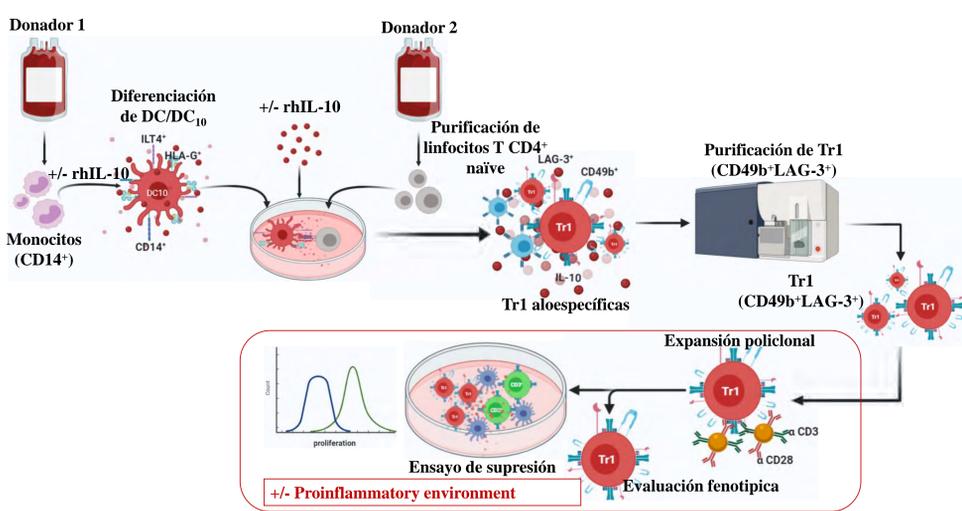
SAUL ARTEAGA¹, ARIMELEK CORTES¹, EVELYN ALVAREZ¹, KATYA ROSAS¹, Morales-Buenrostro LE², JOSEFINA ALBERU³, GLORIA SOLDEVILA¹
 1 Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM Ciudad de México, México. Departamento de nefrología y metabolismo mineral, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y nutrición Salvador Zubirán, Ciudad de México, México. 3 Escuela de Medicina y Ciencias de la salud, Tecnológico de Monterrey, Ciudad de México, México.

Introducción

Los linfocitos T reguladores tipo 1 (Tr1) son células FoxP3⁺, que pueden ser identificadas con base en la co-expresión de las moléculas de superficie CD49b y LAG-3 en conjunto con una alta producción de IL-10. Sin embargo, se ha demostrado recientemente que existe cierta heterogeneidad dentro de las poblaciones CD49b⁺LAG3⁺, dentro de las cuales, existe una población con una alta capacidad supresora, la cual se caracteriza por una alta producción de IL-10 así como la co-expresión de receptores coinhibitorios entre los que destacan PD-1, CTLA-4, CD39, TIM-3 and TIGIT.

El uso de poblaciones celulares, que contienen linfocitos Tr1, diferenciadas *in vitro*, han demostrado tener buenos resultados en su uso como terapia celular, sin embargo, las metodologías actuales han presentado dificultades para la obtención de un producto celular conformado por altos porcentajes de linfocitos Tr1 CD49b⁺LAG3⁺ (>15%) alcanzando números necesarios por kilogramos de paciente para su uso como terapia celular. Por todo lo anterior, resulta fundamental el desarrollo de una terapia celular que permita la diferenciación *in vitro* y purificación de linfocito Tr1 aloespecíficos, el establecimiento de un protocolo de expansión que permita la obtención de número necesarios con una mejor caracterización, así como evaluar su estabilidad fenotípica y funcional del producto celular para asegurar su función supresora *in vivo* a largo plazo y su posterior uso para el establecimiento de tolerancia a largo plazo en el contexto de trasplante de órganos.

Metodología



Resultados

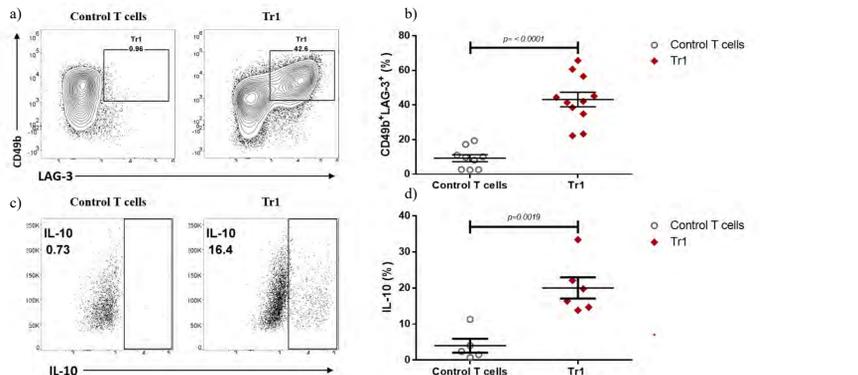


Figura 1. Diferenciación de altos porcentajes de linfocitos Tr1 aloespecíficos mediante DC₁₀. a) Countour-plot representativo de la co-expresión de CD49b y LAG-3 en los cultivos con condiciones no polarizantes (izquierda) y en cultivos con las condiciones de diferenciación a Tr1 (derecha). b) Resumen de experimentos de la coexpresión de CD49b y LAG-3 (n=7). c) Dot-plot representativo de la producción de IL-10 a partir de la población CD49b⁺LAG-3⁺ en los controles no polarizantes (izquierda) y en cultivos con las condiciones de diferenciación a Tr1 (derecha). d) Gráfica de la producción de IL-10 (n=6). Las gráficas representan el promedio ± SEM.

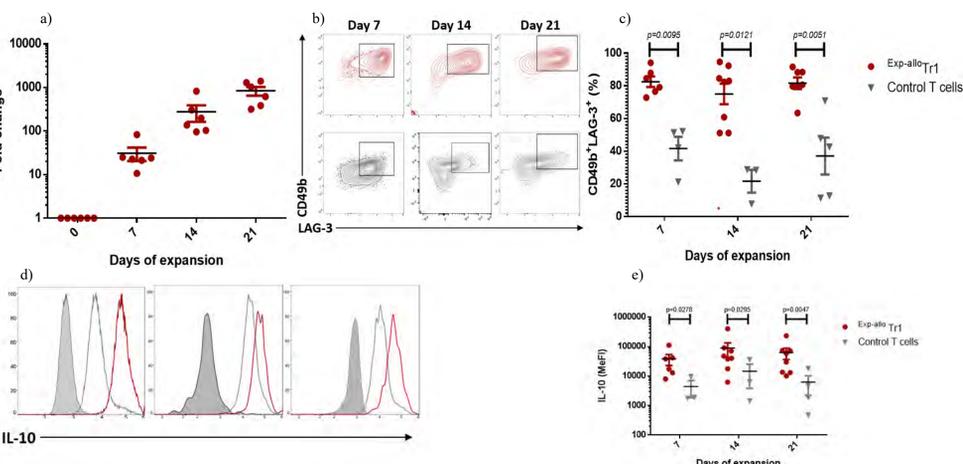


Figura 2. Los linfocitos Tr1 aloespecíficos purificados incrementan sus números significativamente después de la expansión policlonal, manteniendo su fenotipo y mejorando su capacidad productora de IL-10. a) Incremento relativo del número de linfocitos Tr1 purificados y expandidos durante 3 ciclos con base en su número inicial (n=6). b) Dot-plot representativo del fenotipo de Tr1 (CD49b⁺LAG-3⁺) después de 3 ciclos de expansión. c) Porcentajes de expresión del fenotipo de Tr1 después de cada ciclo de expansión. e) Porcentajes de la producción de IL-10 después de cada ciclo de expansión. d) Histogramas representativos de la producción de IL-10 durante 3 ciclos de expansión. e) Gráfica representativa de la intensidad mediana de fluorescencia de IL-10 después de cada ciclo de expansión (n=7).

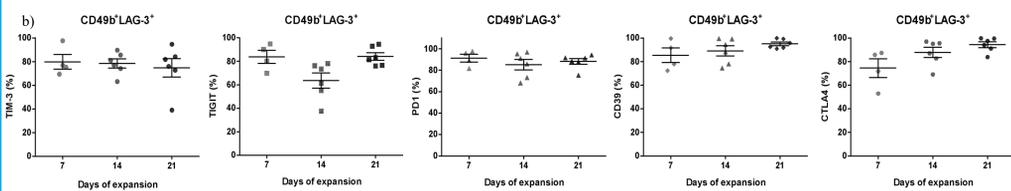
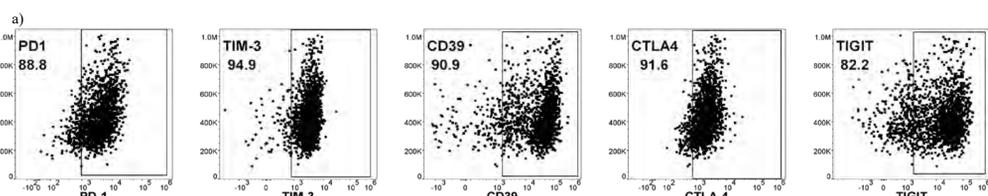


Figura 3. Los linfocitos Tr1 expandidos expresan un fenotipo regulador enriquecido. a) Dot-plots representativo de la expresión de PD1, TIM-3, CD39, CTLA-4 y TIGIT a partir de la población CD49b⁺LAG-3⁺ después de 3 ciclos de expansión. b) Gráfica representativa del porcentaje de: PD1, TIM-3, CD39, CTLA-4 y TIGIT. Los datos representan el promedio ± SEM.

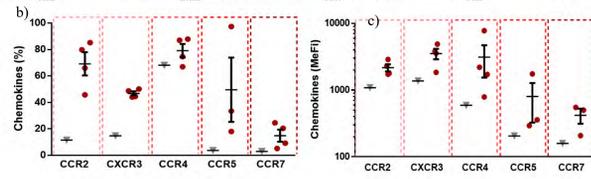
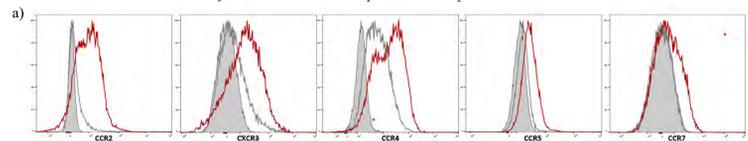


Figura 4. Perfil de expresión de receptores de quimiocinas expresado en linfocito Tr1 aloespecíficos expandidos. a) Dot-plots representativo de la expresión de CCR2, CXCR3, CCR4, CCR5 y CCR7 a partir de la población CD49b⁺LAG-3⁺ después de 3 ciclos de expansión. b) Gráfica representativa del porcentaje de: CCR2, CXCR3, CCR4, CCR5 y CCR7. c) Gráfica representativa de la intensidad mediana de fluorescencia de: CCR2, CXCR3, CCR4, CCR5 y CCR7.

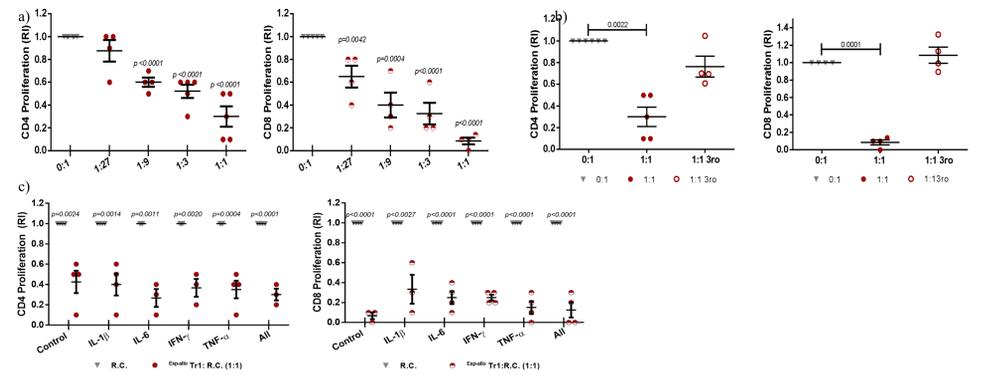


Figura 5. Los linfocitos Tr1 expandidos suprimen eficientemente linfocitos T alógenicos. a) Incrementos relativos de los porcentajes de proliferación con respecto a las células T respondedoras CD4⁺ y CD8⁺ (R.C) (izquierda y derecha respectivamente). b) Incrementos relativos de los porcentajes de proliferación con respecto a las células T respondedoras CD4⁺ y CD8⁺ (R.C) (izquierda y derecha respectivamente) a partir de un individuo no relacionado. c) Porcentaje de supresión aloespecífica con respecto a las células T respondedoras CD8⁺ (R.C) (izquierda), o al control a partir de un individuo no relacionado (derecha). d) Incrementos relativos de los porcentajes de proliferación con respecto a las células T respondedoras CD4⁺ y CD8⁺ (R.C) (izquierda y derecha respectivamente) en ensayos realizados en presencia de citocinas proinflamatorias (IL-1β, IL-6, IFN-γ, TNF-α).

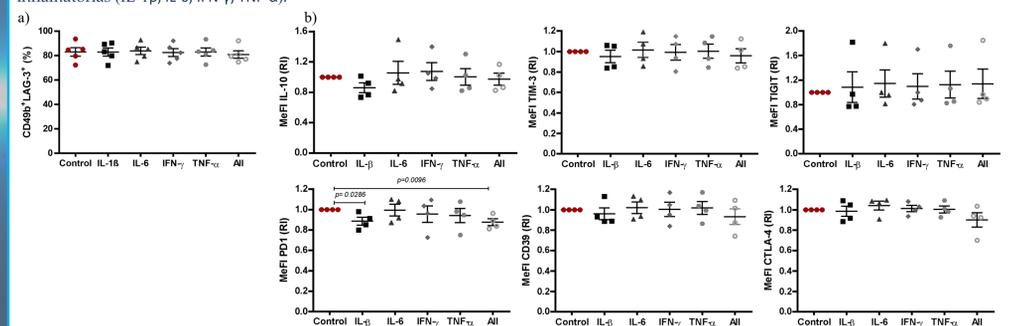


Figura 5. Los linfocitos Tr1 mantienen de manera estable su fenotipo después de ser expandidos en un ambiente pro-inflamatorio. a) Porcentajes de la co-expresión de CD49b⁺LAG-3⁺ en células Tr1 posterior a 2 ciclos de expansión en presencia o ausencia de citocinas proinflamatorias (IL-1β, IL-6, IFN-γ, TNF-α). b) Gráficas representativas de la intensidad mediana de fluorescencia (Incrementos relativos) para la producción de IL-10 y la expresión de TIGIT, TIM-3, PD1, CD39 y CTLA-4 posterior a 2 ciclos de expansión en presencia o ausencia de citocinas proinflamatorias (IL-1β, IL-6, IFN-γ, TNF-α).

Conclusión

- Establecimos un eficiente método de purificación y expansión de linfocitos Tr1 aloespecíficos.
- Se obtuvo un alto porcentaje de células productoras de IL-10 (> 90%) a partir de la población de Tr1 CD49b⁺LAG-3⁺ (80%) posterior a la diferenciación *in vitro*, la purificación y expansión policlonal.
- Los linfocitos Tr1 (CD49b⁺LAG-3⁺) co-expresan altos porcentajes de receptores co-inhibitorios (TIGIT⁺, CD39⁺, CTLA4⁺, PD1⁺ y TIM-3⁺) además de una alta producción de IL-10.
- Los linfocitos Tr1 (CD49b⁺LAG-3⁺) demuestran tener una tendencia a una alta expresión de receptores quimiocinas (CCR2, CXCR3, CCR4, CCR5 y CCR7) relevantes en un contexto de trasplante con respecto a los controles.
- Nuestras poblaciones de linfocitos Tr1 expandidos suprimen de manera aloespecífica la proliferación de células T respondedoras en presencia o ausencia de citocinas proinflamatorias (IL-1β, IL-6, IFN-γ, TNF-α).
- La presencia de citocinas proinflamatorias no afecta el fenotipo de los linfocitos Tr1.