

Mecanismos de tolerancia en la enfermedad de Crohn

MARISOL VENY Y AZUCENA SALAS

Laboratorio de Gastroenterología Experimental. IDIBAPS. Hospital Clínic. Barcelona. España.

(Comentario crítico del artículo: Iliev ID, Spadoni I, Mileti E, et al. Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. Gut. 2009;58:1481-9.)

La tolerancia inmunitaria consiste en diferenciar los antígenos ajenos de los antígenos que son propios del organismo con la finalidad de no generar una respuesta inmunitaria frente a estos últimos. Este mecanismo tiene que ser especialmente activo y finamente regulado en el intestino donde hay una gran superficie de interacción entre antígenos ajenos y nuestro sistema inmunitario. En la enfermedad de Crohn se da una pérdida de la tolerancia inmunitaria frente a antígenos bacterianos presentes en el lumen intestinal y, como consecuencia, aparece una respuesta inflamatoria crónica.

Los linfocitos T reguladores son las principales células efectoras de la tolerancia inmunitaria, pero el mecanismo por el cual estas células son generadas en el intestino está todavía por describir. A su vez, las células dendríticas, presentadoras profesionales de antígenos tienen un papel clave en la inducción de un fenotipo u otro en los linfocitos con los que interactúan y, por lo tanto, hablamos también de células dendríticas to-

lerogénicas cuando estas células son capaces de dirigir la diferenciación, activación o proliferación de linfocitos Treg con capacidad supresora.

El conocimiento sobre los mecanismos que median la inducción de tolerancia inmunitaria en el intestino abre nuevas vías de investigación para el estudio de la pérdida de tolerancia en la enfermedad de Crohn.

Interacción epitelio-células dendríticas

El intercambio de información entre el epitelio intestinal y las células dendríticas presentes en la lámina propia se ha revelado durante estos últimos 10 años como un proceso clave en la regulación de la homeostasis intestinal.

El laboratorio de Maria Rescigno, en un trabajo pionero¹, describió elegantemente el contacto entre el epitelio intestinal y una subpoblación de células dendríticas de la lámina propia que presentan la facultad de extender protrusiones hasta el lumen intestinal donde pueden detectar compuestos bacterianos. Trabajos paralelos de otros laboratorios han mostrado que las células dendríticas de tejidos intestinales están especializadas en inducir tropismo intestinal ($CCR9^+ \alpha 4\beta 7^+$)^{2,3} y fenotipo regulador ($Foxp3^+$) en linfocitos $T^{4,6}$. Recientemente, estas dos observaciones han sido integradas demostrándose que tanto en ratón como en humanos las células epiteliales intestinales (CEI) están implicadas en la educación de las células dendríticas vecinas aportándoles un fenotipo tolerogénico^{7,8}.

En un reciente estudio con células humanas, Rescigno et al muestran que las CEI, tanto la línea celular Caco-2 como las líneas primarias aisladas directamente de muestras intestinales humanas, son capaces de educar células dendríticas derivadas de monocitos circulantes y estas, a su vez, de inducir la diferenciación de Treg, apoyando la hipótesis de que las células dendríticas residentes en tejido están moduladas por el ambiente en que se encuentran.

Cuando linfocitos T vírgenes (linfocitos que no han encontrado el antígeno al que reconocen) son cultivados con células dendríticas condicionadas por CEI (CD_{CEI}), se detecta un incremento en los transcritos de ARN mensajero (ARNm) de FOXP3, factor de transcripción específico de las Tregs, así

Puntos clave

- La tolerancia inmunitaria es un mecanismo clave para el mantenimiento de la homeostasis intestinal.
- En la enfermedad de Crohn se da una pérdida de la tolerancia inmunitaria hacia los antígenos bacterianos presentes en el tracto intestinal.
- La barrera epitelial intestinal no actúa tan sólo como barrera física, sino que, entre otras funciones, tiene un papel en la inducción de la tolerancia mediante el efecto de las células dendríticas.
- No se ha descrito un solo factor producido por las células epiteliales suficiente para la educación de las células dendríticas, sino que es necesaria la acción conjunta de varios de ellos (ácido retinoico, $TGF\beta$, TSLP y, probablemente, otros aún por describir).
- Las células epiteliales intestinales aisladas de pacientes con enfermedad de Crohn presentan una menor capacidad de producción de los citados factores protolerogénicos.

como en el porcentaje de células Foxp3^+ . Además, estas Tregs son capaces de inhibir la proliferación de linfocitos T efectores, con lo que se pone de manifiesto su naturaleza supresora.

Los mecanismos involucrados en la transmisión de este fenotipo tolerogénico por parte de las CEI incluyen la producción de TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*), ácido retinoico (AR) y TGF β (*transforming growth factor*). Estos factores pueden ser secretados por el epitelio intestinal y se han descrito en modelos murinos como factores inductores de tolerancia e inhibidores de respuestas efectoras tipo Th1^{4,9,10}. La eliminación de cualquiera de ellos del sobrenadante del cultivo de las CEI afecta de forma negativa a la educación de las células dendríticas (inducen menor número de células Treg), aunque, por otro lado, ninguno de estos factores por sí solo (a menos que se adicione a concentraciones no fisiológicas muy altas) puede inducir tolerancia en las células dendríticas. Esta observación señala que se pueden dar efectos sinérgicos o que otros factores, aún por describir, derivados de las CEI pueden tener un papel fundamental.

Alteraciones de la interacción epitelio-células dendríticas en la enfermedad de Crohn

El propio grupo de Rescigno demostraba ya en un artículo de 2005 que las CEI provenientes de pacientes con EC producen una menor cantidad de TSLP¹⁰. En el artículo comentado han mostrado, además, un defecto en la expresión de los genes TGF β 1 y ALDH1A1 (enzima responsable de metabolizar AR) en las áreas de mucosa no inflamada de pacientes con EC. Según esta observación, los sobrenadantes de las CEI de estos pacientes son mucho menos eficientes en la inducción de la diferenciación de células Treg Foxp3^+ en comparación con los sobrenadantes de CEI provenientes de individuos sanos. La importancia fisiológica de estas observaciones resta aún por resolver. Una hipótesis atractiva es que las CEI de la mucosa de pacientes con EC no tienen suficiente capacidad de educar a las células dendríticas hacia un fenotipo tolerogénico, debido a la menor expresión de los genes mencionados. Dado que las CEI utilizadas en estos experimentos fueron obtenidas de mucosa intestinal no inflamada de individuos con EC, la alteración descrita podría representar un defecto innato, y no el resultado del proceso inflamatorio activo. Si ese fuera el caso, esperaríamos detectar un menor número y/o una función alterada de las células Treg Foxp3^+ en la mucosa no inflamada de los pacientes con EC. El tracto intestinal es un lugar bien reconocido de diferenciación de Treg fuera del timo, y las implicaciones de un déficit en el número y/o función se han descrito ampliamente en ratones y, en menor grado, en humanos¹¹. De esta forma, cabría esperar que un defecto en la diferenciación de Treg en el tracto intestinal tuviera consecuencias negativas en la homeostasis intestinal.

Los estudios llevados a cabo para esclarecer esta cuestión son todavía inconcluyentes: si bien se ha descrito un aumento en el número de células Treg Foxp3^+ en la mucosa intestinal inflamada de pacientes con EC, no existen datos convincentes sobre el número de células $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^+$ presentes en las áreas de mucosa quiescente o no inflamada¹¹. Sí se ha descrito un

menor número de Treg $\text{CD8}^+\text{Foxp3}^+$ en la mucosa intestinal de pacientes con EC y se ha relacionado con una funcionalidad deficiente por parte de las CEI¹². De esta forma, una posibilidad interesante que creemos que debe ser considerada es que, debido al defecto innato descrito en las CEI, se produce un déficit en el número y/o en la función de las células Foxp3^+ presentes en el intestino, lo cual constituiría un mecanismo de desregulación de la respuesta inmunitaria frente a la flora comensal intestinal.

Células dendríticas tolerogénicas CD103^+

Algunos artículos recientes han identificado el marcador CD103 (subunidad alfa de la integrina $\alpha\text{E}\beta 7$) como característico de las células dendríticas tolerogénicas del tracto intestinal. Las células dendríticas murinas CD103^+ presentes en los nódulos linfáticos del mesenterio (NLM) y en el intestino delgado son capaces de inducir en linfocitos T la expresión de Foxp3 y del receptor CCR9 que les confiere tropismo intestinal^{4,13}.

Hasta donde llega nuestro conocimiento, no hay datos publicados al respecto de células dendríticas intestinales aisladas de tejido humano. Para analizar la importancia del marcador CD103 en células dendríticas intestinales humanas, Iliev et al. aíslan células dendríticas $\text{CD11c}^+\text{HLA-DR}^+\text{lin}^-$ de NLM y las separan según sean CD103^+ o CD103^- . Los autores describen varias diferencias entre estas dos poblaciones de células dendríticas del NLM: a) las células dendríticas CD103^+ expresan más CCR7 (receptor que confiere tropismo a NLM), lo que apunta a que estas células pueden representar una población con capacidad de migración a NLM; b) las células dendríticas CD103^+ promueven la diferenciación de células Treg de forma más eficiente que las células dendríticas CD103^- , y c) las células dendríticas CD103^+ presentan menor capacidad de diferenciar linfocitos al tipo efector Th1.

Con todos estos datos, los autores concluyen que la subunidad CD103 es también en humanos un marcador de células dendríticas tolerogénicas. Los autores señalan, además, que la población de células dendríticas tolerogénicas $\text{CD103}^+\text{CCR7}^+$ del NLM puede representar un tipo de células dendríticas migratorias provenientes del intestino, aunque esta hipótesis es difícil de probar en humanos. En ratón, se han descrito¹⁴, en la lámina propia intestinal, diferentes poblaciones de células dendríticas y macrófagos, incluyendo las células dendríticas tolerogénicas CD103^+ , las células subepiteliales CX3CR1^+ y los macrófagos $\text{CD11b}^+\text{F4/80}^+\text{CD11c}^-$. Según Iliev et al., las células dendríticas tolerogénicas se encuentran irreversiblemente diferenciadas y, por lo tanto, no responderán a estímulos inflamatorios o microbianos.

En un artículo anterior del propio laboratorio de la Dra. Rescigno, ya se mostraba que el enfrentamiento de células dendríticas tolerogénicas con un estímulo pro-Th1, como *S. typhimurium*, no induce la esperada respuesta proinflamatoria¹⁰. Los autores proponen que la responsabilidad de generar una respuesta inmunitaria eficiente cuando se detecta la presencia de algún patógeno u otro estímulo antigénico extraño recae entonces en monocitos o células dendríticas recién reclutadas al tejido. Además, señalan que una posible población cercana

al tejido intestinal y lista para actuar ante una señal de alarma pueden ser las células dendríticas CCR6⁺ residentes en las placas de Peyer¹⁵ y no influidas por la educación de las CEI.

En este aspecto, estudios en humanos han identificado macrófagos CD14⁺ en muestras colónicas de pacientes con EC. Esta población, casi inexistente en el colon de individuos sanos, produce una gran cantidad de IL-23 y TNF α , citocinas que a la vez promueven la producción de IFN γ por parte de los linfocitos T¹⁶. Esta podría representar una población de células presentadoras no educadas con alta capacidad para inducir respuestas de tipo Th1. De este modo, aparte del papel de las células dendríticas tolerogénicas intestinales que median la diferenciación de Treg y previenen la pérdida de tolerancia, también otras poblaciones de células dendríticas y/o macrófagos no educados y, por lo tanto, con un fenotipo inmunogénico y no tolerogénico pueden tener un papel en el intestino durante el desarrollo de la EC.

En este punto debemos resaltar la importancia de la estabilidad de las células dendríticas tolerogénicas cuando no se hallan en un entorno protolerogénico o en respuesta a activación, ya que es un conocimiento relevante si se piensa en el uso de células dendríticas tolerogénicas como terapia para pacientes con EC activa.

Conclusiones

Las hipótesis discutidas en este artículo presentan implicaciones terapéuticas potenciales y apoyan el uso de estrategias que promuevan específicamente el desarrollo de tolerancia en el tracto intestinal, ya sea incrementando la producción o señalización de factores como el TGF β y el TSLP o mediante la administración de células dendríticas tolerogénicas. El TGF β es una citocina pleiotrópica que lleva a cabo importantes funciones, tanto en tolerancia como en generación de inmunidad. Puede ser producida por una gran cantidad de células de la mucosa intestinal, y su síntesis y activación se encuentran finamente reguladas. Como se muestra en el artículo, el TGF β producido por el epitelio actúa sobre las células dendríticas induciendo la fosforilación de SMAD2 que, a su vez, activa la producción de más TGF β por parte de las células dendríticas. Otras células, como las Treg y los fibroblastos, también pueden producir esta citocina en determinadas circunstancias. Además de sus conocidas funciones protolerogénicas, regulatorias y regenerativas, el TGF β , producido en grandes cantidades en la inflamación intestinal, tiene un papel importante en el desarrollo del cáncer colorrectal. Este amplio abanico de funciones que cubre el TGF β hace replantear la estrategia de aumentar la producción o señalización de esta citocina.

De otro lado, el TSLP podría ser una diana más conveniente. Es conocida la función del TSLP sobre la inducción de células Treg en el timo a través de su acción sobre células dendríticas⁹ y también su capacidad para reducir las respuestas de tipo Th1¹⁰. En condiciones de homeostasis intestinal, el TSLP producido por CEI influye en las células dendríticas para generar respuestas de tipo Th2 y, como se muestra en el artículo, puede también tener un papel en la educación de las células dendríticas para que dirijan la diferenciación de Treg. De todas

formas, quedan aún muchas cosas por esclarecer sobre el papel que tiene esta citocina en la homeostasis intestinal. Como ya hemos discutido, sólo cuando se adicionan concentraciones muy altas de TSLP al cultivo, se induce la conversión a Treg. Además, estudios murinos muestran que las células dendríticas TSLPR^{-/-} presentan la misma capacidad que las células dendríticas wt para dirigir la diferenciación de Treg en respuesta al condicionamiento con sobrenadantes de CEI. Otro factor que debemos tener en cuenta a la hora de considerar esta citocina como posible estrategia terapéutica es que, por el momento, no disponemos de conocimiento sobre la regulación de la producción del TSLP por parte de las CEI y otras células estromales en condiciones de inflamación intestinal.

En resumen, la línea de investigación discutida tiene el potencial de abrir nuevos caminos terapéuticos en la EC, al tiempo que apunta, una vez más, a defectos en la función del epitelio intestinal como responsables de dirigir la inflamación intestinal.

Bibliografía



● Importante ●● Muy importante

- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol.* 2001;2:361-7.
- Mora JR, Bono MR, Manjunath N, Weninger W, Cavanagh LL, Roseblatt M, et al. Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature.* 2003;424:88-93.
- Johansson-Lindbom B, Svensson M, Wurbel MA, Malissen B, Marquez G, Agace W. Selective generation of gut tropic T cells in gut-associated lymphoid tissue (GALT): requirement for GALT dendritic cells and adjuvant. *J Exp Med.* 2003;198:963-9.
- Coomes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med.* 2007;204:1757-64.
- Benson MJ, Pino-Lagos K, Roseblatt M, Noelle RJ. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med.* 2007;204:1765-74.
- Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, et al. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med.* 2007;204:1775-85.
- Iliev ID, Mileti E, Matteoli G, Chieppa M, Rescigno M. Intestinal epithelial cells promote colitis-protective regulatory T-cell differentiation through dendritic cell conditioning. *Mucosal Immunol.* 2009;2:340-50.
- Iliev ID, Spadoni I, Mileti E, Matteoli G, Sonzogni A, Sampietro GM, et al. Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *Gut.* 2009;58:1481-9.
- Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Wang YH, Cao W, et al. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature.* 2005;436:1181-5.
- Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, Avogadri F, Sonzogni A, Sampietro GM, et al. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol.* 2005;6:507-14.
- Izcue A, Coomes JL, Powrie F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:313-38.
- Brimmes J, Allez M, Dotan I, Shao L, Nakazawa A, Mayer L. Defects in CD8+ regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease. *J Immunol.* 2005;174:5814-22.
- Jaensson E, Uronen-Hansson H, Pabst O, Eksteen B, Tian J, Coomes JL, et al. Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *J Exp Med.* 2008;205:2139-49.
- Denning TL, Wang YC, Patel SR, Williams IR, Pulendran B. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat Immunol.* 2007;8:1086-94.
- Iliev ID, Matteoli G, Rescigno M. The yin and yang of intestinal epithelial cells in controlling dendritic cell function. *J Exp Med.* 2007;204:2253-7.
- Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kobayashi T, Sato T, et al. Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J Clin Invest.* 2008;118:2269-80.

Bibliografía recomendada

Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:313-38.

Resumen de las principales poblaciones de linfocitos presentes en la lámina propia intestinal y los mecanismos principales de regulación. Énfasis en el papel de los linfocitos T reguladores que median su función a través de la producción de IL-10 y TGF β . Alteraciones de esta población que llevan a la aparición de inflamación intestinal.

Tsuji NM, Kosaka A. Oral tolerance: intestinal homeostasis and antigen-specific regulatory T cells. *Trends Immunol.* 2008;29:532-40.

Revisión sobre la homeostasis intestinal que analiza el papel de las células presentadoras de antígeno intestinales, las células dendríticas tolerogénicas, la importancia de diferentes citocinas en la generación de la tolerancia oral, así como la estabilización y función de los linfocitos T reguladores.

Shale M, Ghosh S. How intestinal epithelial cells tolerise dendritic cells and its relevance to inflammatory bowel disease. *Gut.* 2009;58:1291-9.

Revisión sobre la función del epitelio intestinal, su interacción con las células dendríticas, la presentación de antígenos y la influencia de todo ello en la generación de células T efectoras y reguladoras. Se comentan las alteraciones de todos estos procesos descritas en la enfermedad inflamatoria intestinal.

Laffont S, Siddiqui KR, Powrie F. Intestinal inflammation abrogates the tolerogenic properties of MLN CD103+ dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2010;40:1877-83.

Artículo original en el que se investiga la alteración de las células CD103⁺ presentes en los nódulos mesentéricos en condiciones de inflamación intestinal en un modelo murino experimental. Los resultados ponen de relieve la importancia de las condiciones ambientales ya que, en situación de inflamación, las células dendríticas CD103⁺ disminuyen su capacidad tolerogénica y aumentan su capacidad de inducir linfocitos Th1 productores de IFN γ .