

Descripción del papel de las ILC3 en modelos de enfermedad intestinal inflamatoria infecciosa



Ana Valle Noguera



Lucía Sancho Temiño

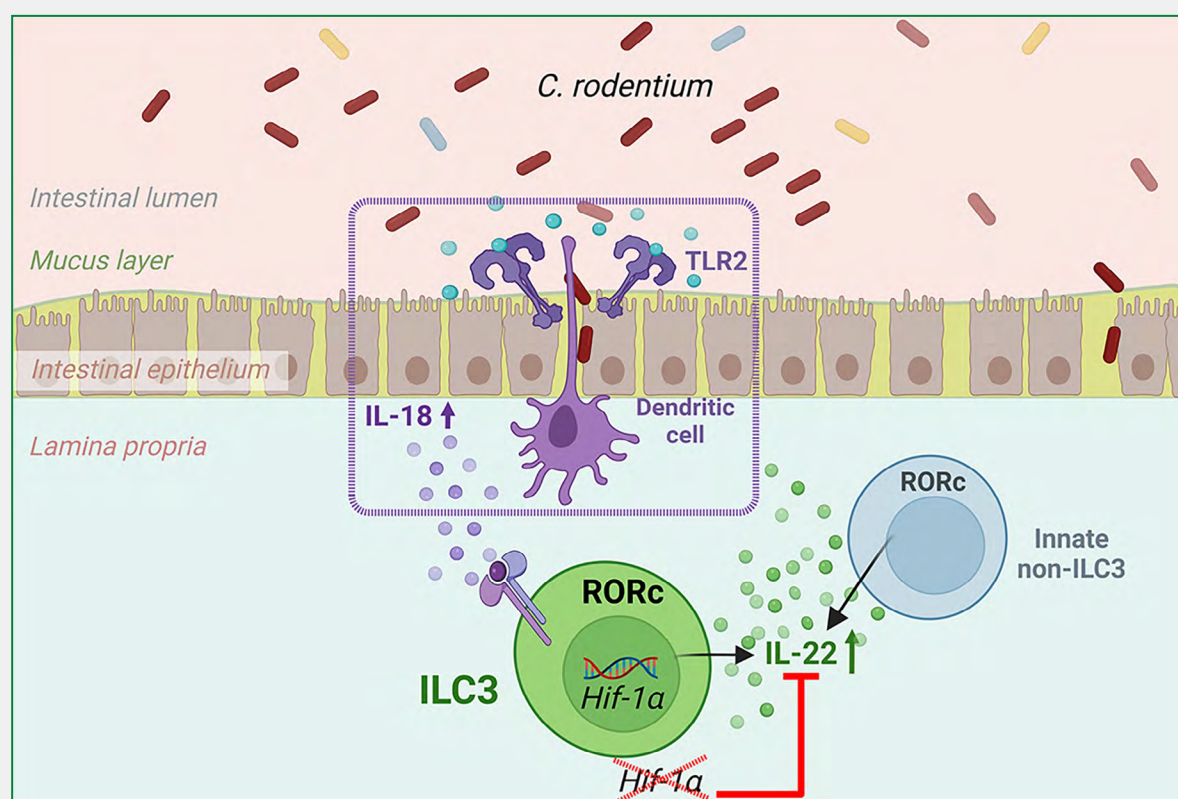


Raquel Castillo González

RESUMEN

En este artículo publicado en Cell Reports por el grupo de la Dra. Arantxa Cruz Adalia, del departamento de Inmunología, Oftalmología y Otorrinolaringología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, se ha analizado el papel de las células linfoides innatas de tipo 3, una población inmunitaria identificada recientemente. En él se describe su papel fundamental en la defensa de las barreras tisulares, en concreto la del epitelio intestinal, de patógenos invasores, como es el caso de la bacteria *Citrobacter rodentium* para roedores. El trabajo detalla los mecanismos moleculares que regulan las células ILC3

para favorecer la resistencia a infecciones en un modelo de ratón mediante la producción de IL-22. El grupo ha descrito que la activación de HIF-1 α en las células ILC3 está implicada en la producción de citoquinas, no solo a través de la hipoxia como se había indicado previamente, sino también mediante otros mecanismos transcripcionales independientes de oxígeno. Gracias a este estudio, se ha comprobado que ratones transgénicos que presentan una inactivación específica del gen *Hif1a* en las células ROR γ t⁺ innatas (*Rag1*^{-/-}*Hif1a*^{f/f Δ Rorc}) padecen una colitis más grave tras la infección por *C. rodentium*. Estos animales no regulan correctamente



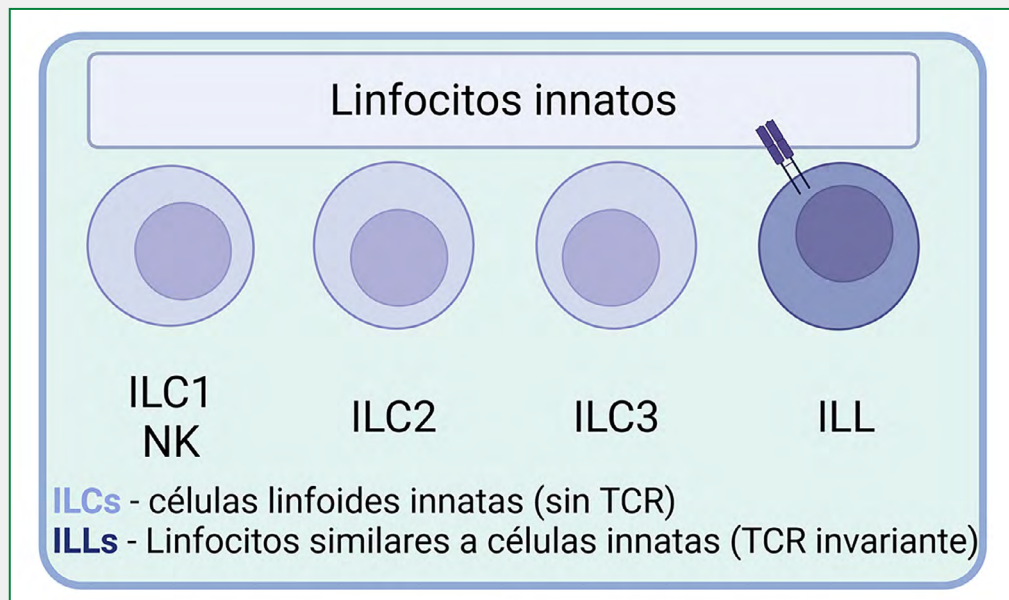
la producción de IL-22 durante la infección, presentando un déficit en la misma. Mediante aislamiento específico de poblaciones innatas, se ha observado que únicamente las células ILC3 dependen de la actividad HIF-1 α para producir IL-22. Sin embargo, las células innatas no ILC3s RORyt+, que también producen IL-22, no se ven afectadas por esta deficiencia. Los autores también proponen un papel regulador para IL-18 en este proceso. Esta interleucina sería inducida por la activación del receptor Toll-like 2 (TLR2) en respuesta a moléculas liberadas por los pa-

tógenos (PAMPS) durante la infección intestinal. La unión de IL-18 a su receptor específico en las ILC3 desencadena de forma selectiva la producción y secreción de IL-22 a través de la regulación transcripcional del gen de *Hif1a*. Por tanto, los resultados del trabajo destacan que, durante la etapa tardía de la infección por *C. rodentium*, la inducción de IL-18 en el colon promueve la producción de IL-22 a través de HIF-1 α en las células ILC3, lo cual es crucial para la protección contra este patógeno.

Cita

Valle-Noguera A, Sancho-Temiño L, Castillo-González R, Villa-Gómez C, Gomez-Sánchez MJ, Ochoa-Ramos A, Yagüe-Fernández P, Soler Palacios B, Zorita V, Raposo-Ponce B, González-Granado JM, Aragonés J, Cruz-Adalia A. IL-18-induced HIF-1 α in ILC3s ameliorates the inflammation of *C. rodentium*-induced colitis. Cell Rep. 2023 Dec 26;42(12):113508. doi: 10.1016/j.celrep.2023.113508. Epub 2023 Nov 28. PMID: 38019650.

Miniglosario



¿Qué pregunta queráis responder con este artículo?

Todas: La principal pregunta del estudio era determinar el papel de las ILC3 en procesos que tengan que ver con la fisiología del intestino, como es la enfermedad inflamatoria intestinal. Debido a que el campo de las ILC3s es relativamente nuevo no hay muchos estudios sobre los mecanismos moleculares que las regulan.

¿Es esto nuevo en el campo?

Todas: Este trabajo ha permitido conocer algunas de las vías moleculares que modulan las funciones de las ILC3s. Se había visto que las ILC3 tienen una función protectora frente a la infección de *Citrobacter rodentium* mediante la secreción de IL-22 e IL-17. Y otros autores habían sugerido que la hipoxia podría ser un regulador fundamental de las funciones de estas células. Sin embargo, todo el trabajo previo encontrado en la literatura se había desarrollado *in vitro* o bien en animales sometidos a hipoxia e infectados con *Clostridium difficile*. Nos planteamos si HIF-1 α podría estar implicado en el control de la expresión génica en respuesta a la infección, y por eso generamos ratones deficientes en poblaciones específicas, para poder centrarnos en las ILC3. Nuestro planteamiento fue innovador al generar animales sobre fondo *Rag1*^{-/-} y así conseguir una depleción selectiva del factor HIF-1 α en las células innatas. Así, podíamos evitar una posible función de las células T, que también pueden expresar el factor ROR γ t.

¿Cuál fue la idea de la que surgió la publicación?

Todas: La idea surgió de unos estudios realizados en células T CD4 en las que HIF-1 α promueve la diferenciación de Th17 y aumenta la producción de IL-17. También se había descrito mediante algunos experimentos *in vitro* que podría estar implicado en la producción de IL-22 en los linfocitos CD4. Dado que las ILC3 son homólogas innatas de las células Th17 y comparten funciones similares, hipotetizamos que HIF-1 α

podría estar implicado en la modulación de la función de las ILC3 durante procesos inflamatorios.

¿Cuál fue el experimento estrella para testar vuestra hipótesis?

Todas: Esta pregunta es difícil; escoger un único experimento tiene muchas implicaciones. Sin embargo, si tuviéramos que resumirlo muy brevemente empezaríamos diciendo que el experimento de infección de los animales *Rag1*^{-/-} *Hif1a* ^{Δ Rorc} usando ratones *Rag1*^{-/-} *Hif1a*^{fl/fl} como control permite detectar niveles de IL-22 menores en las ILC3s deficientes en HIF-1 α , además de que estos animales presentan una mayor severidad en el desarrollo de la enfermedad.

Para demostrar el mecanismo molecular, se observó que un agonista para TLR2 en combinación con IL-2 aumentaba la secreción de IL-22 en explantes de colon de ratones control y no en los ratones *Rag1*^{-/-} *Hif1a*^{fl/ Δ Rorc}. Además, esta secreción se inhibía al bloquear IL-18 con el compuesto específico BP IL18, demostrando que HIF-1 α es fundamental para la inducción de IL-22 en las ILC3 en respuesta a la estimulación de IL-18 producido por la activación de TLR2.

¿Qué pregunta se ha quedado en el tintero y debería ser explorada?

Todas: Desde luego, estaría muy bien saber cuál es la regulación molecular de la producción de IL-17 en las ILC3s. Hemos descubierto durante el transcurso de este estudio que la regulación de IL-17 es diferente a la de IL-22. HIF-1 α no parece modular los niveles de IL-17 en homeostasis o durante la infección, puesto que no vemos diferencias entre los ratones transgénicos que hemos estudiado. Sin embargo, en otros estudios sobre otros factores no han visto diferencias entre ambas citoquinas.

También nos queda pendiente por estudiar la regulación de IL-22 por HIF-1 α en homeostasis, que parece inversa a lo que sucede durante la infección.

Las autoras nos responden

¿Qué modelo experimental os gustaría desarrollar después para ello?

Todas: Sería interesante estudiar otros modelos de enfermedad inflamatoria intestinal. Hemos estudiado un modelo de colitis infeccio-

sa, y querríamos saber si los mecanismos que actúan en este proceso son similares a otros modelos de colitis no infecciosos, por ejemplo, los inducidos por productos químicos como el DSS, y así comprobar si se trata de un mecanismo general.

¿Cómo sentís respecto al trabajo?

Todas: Nos gusta mucho el trabajo que hemos hecho. Nos sentimos muy orgullosas de lo que hemos conseguido.

Ana: Ha sido una verdadera carrera de relevos. Empezamos Arantxa y María José y yo, después siguieron Lucía y Cristina.

Raquel: Y al poco tiempo me incorporé yo.

Lucía: La verdad es que hay que reconocer que, con tantas manos, y obteniendo los mismos resultados, tenemos la seguridad de que son consistentes.

La mayor dificultad:

Todas: El tiempo que requieren los experimentos, lo cuidadoso que se debe ser al crecer la bacteria, que no se contamine con otra especie, y al tratar a los animales. ¡¡Deben de infectarse solo los nuestros, y solo con la bacteria correcta!!

Ana: Reconozco que cundió el pánico más de una vez porque teníamos que cambiar de animalario. Esto ha sucedido varias veces a lo largo del estudio, por diversas causas.

Lucía: Hubo que migrar, porque el grupo cambió de sitio. También hubo problemas porque hay que usar aisladores y no siempre están disponibles cuando los necesitas.

Raquel: Sí, y mientras generas los ratones, a veces hay que derivar para cambiar de animalario. Todo lleva mucho tiempo.

Ana: La verdad es que ahora tenemos animales estabulados en distintos animalarios; al final, si los resultados se repiten, se tarda. Pero tienes más seguridad en tus propios datos.

Raquel: De todos los modelos animales que he realizado desde mi tesis y ahora en el postdoc, como éste yo creo que ninguno. Había visto modelos de infección antes, pero yo no los había hecho. Con Ana coincidí en unos primeros experimentos, y tenía ya mucha destreza. Después, Arantxa nos ayudó mucho, la verdad.

¿Es complicado conseguir y mantener una cepa bacteriana?

Ana: Pues Arantxa la trajo del laboratorio del Dr. Eric Vivier después de una estancia en su laboratorio, para poder poner a punto el modelo animal. Se cultiva fácilmente, a 37 °C y se la reconoce por su resistencia a antibióticos mediante antibiograma. El vial original vive en el -80 °C, lo guardamos con mucho cuidado, aunque los otros lotes crecen bien. Y en el agar MacConkey es de color rosa. Nos llevamos bien.

¿Qué tal la colaboración entre científicos?

Ana: Es importante poder contar con colaboradores que te faciliten el acceso a los equi-

pos necesarios para realizar todas las técnicas que requieren los estudios.

Raquel: Sí, y que exista la posibilidad de cambiar de animalario es algo que tiene mucho que ver con que te puedan acoger en otros, porque siempre hay problemas de espacio. La verdad es que cuando se trabaja con animales esto es muy crítico.

Lucía: Yo, la verdad es que he disfrutado mucho cuando hemos trabajado entre nosotras, en los distintos momentos, y también con otros grupos.

Todas: creemos que hemos sido capaces de coordinarnos sobre todo entre nosotras, y seguimos siendo amigas después de la publicación del artículo.

¿Volveríais a trabajar con las ILC3?

Todas: Pues la verdad es que es complicado trabajar con estas poblaciones por ser minoritarias, pero nuestros datos dicen que son relevantes para el sistema inmunitario. Por eso es fundamental seguir investigando con ellas y sobre ellas.

Ana: Son células inmunitarias innatas; nuestra primera línea de defensa. Son las homólogas innatas de los linfocitos Th17, así que creo que en inflamación van a tener mucha relevancia. Son pocas, pero juegan papeles muy específicos.

Raquel: Sí, además no todo es hipoxia, aunque HIF-1 participe. Es interesante descubrir que hay otros estímulos que activan vías independientes de oxígeno.

Lucía: Si, de hecho, mi proyecto de Tesis Doctoral se centra en estudiar su papel en otras

patologías. Hay grupos muy potentes estudiando esto y me gustaría hacer una estancia internacional para aportar nuevas técnicas al proyecto que estamos llevando a cabo.

¿El experimento que echaréis de menos?

Ana: no vamos a hablar de qué me gusta más, pero sí del que funciona perfecto: los ELISAs para IL-22, IL-17, IL-18. Cuando una tiene una mala semana en el laboratorio, hace un ELISA, y a triunfar. Es antidepresivo.

¿Y el futuro?

Ana: yo soy farmacéutica. Estoy preparando la tesis y la defiendiendo en breve. Ahora trabajo en mi propia farmacia, que es un ámbito muy distinto. Sin embargo, he aprendido a valorar los fármacos que dispenso en su justa medida. Entiendo por qué tienen un precio, viendo el esfuerzo que hay que realizar para encontrarlos, ver para qué sirven, y no digamos ya entrar en ensayos clínicos y llegar al mercado. Y como lo mío eran las infecciones, pues me preocupan las resistencias a antibióticos. Creo que se debe hacer más en ese campo.

Lucía: Yo estoy muy motivada en el laboratorio y me gusta mucho lo que hago. Tengo ganas de seguir avanzando en la tesis e indagar más en los mecanismos moleculares que están regulando la función de las ILC3s.

Raquel: Una vez que terminamos de publicar este artículo nos hemos centrado en los nuevos proyectos del grupo. Aunque el mundo académico es complicado y la inestabilidad reina, estoy animada. Confío en que el tiempo dará sus frutos.

Conclusión

Trabajos difíciles consiguen gran afinidad entre compañer@s.

¡¡Bien hecho!!