

UCH-FC
Biotecnología
R 934
CA



DESCARTE



UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE PREGRADO

**“Metabolismo del triptófano en células dendríticas maduras
con cortos estímulos con lipopolisacárido.”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

NICOLÁS RUIZ-TAGLE PHILLIPS

Dr.

Director de Seminario de Título:

Dr. Juan Carlos Aguilón Gutiérrez

Dr.

Co- Director de Seminario de Título:

Dra. María Carmen Molina Sampayo

Dr.

Patrocinante de Seminario de Título:

Dra. María Rosa Bono Merino

Noviembre de 2010
Santiago - Chile

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

NICOLÁS RUIZ-TAGLE PHILLIPS

“METABOLISMO DEL TRIPTÓFANO EN CÉLULAS DENTRÍTCAS MADURADAS CON CORTOS ESTÍMULOS CON LIPOPOLISACÁRIDO”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dr. Juan Carlos Aguillón Gutiérrez
Director Seminario de Título

Firma manuscrita en azul del Dr. Juan Carlos Aguillón Gutiérrez, sobre una línea horizontal.

Dra. Maria Carmen Molina Sampayo
Co-Director Seminario de Título

Firma manuscrita en negro de Dra. Maria Carmen Molina Sampayo, sobre una línea horizontal.

Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dra. Mercedes López Nitsche
Presidenta Comisión

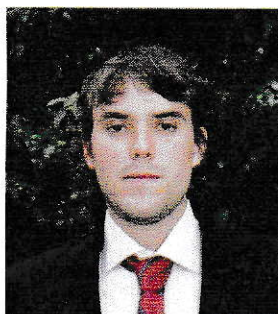
Firma manuscrita en azul de Dra. Mercedes López Nitsche, sobre una línea horizontal.

Dr. Mario Roseblatt Silver
Evaluador

Firma manuscrita en negro de Dr. Mario Roseblatt Silver, sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, Noviembre de 2010

BIOGRAFIA



Nicolás Ruiz Tagle Phillips nació en Santiago de Chile el 9 de marzo de 1982. Desde temprana edad se interesó en los animales y las ciencias básicas, especialmente en la química. En la educación básica Nicolás siguió con sus intereses siempre escogiendo los ramos más cercanos a las ciencias, sabiendo que su vocación y sus posteriores estudios serían en ese campo. Luego en la educación media, se dio cuenta de los avances que estaba teniendo un área nueva en la biología, la Ingeniería genética. Al no ser como la biología clásica solamente descriptiva, y poder realmente modificar a seres vivos con propósitos productivos, fue lo que lo motivó a estudiar Ingeniería en biotecnología molecular en la Universidad de Chile. A finales de su carrera se dio cuenta que para realmente hacer un aporte en esta área debía pasar a la investigación privada, no seguir con un doctorado y seguir la carrera académica, sino que ir a empresas privadas y resolver problemas mediante la biotecnología.

ÍNDICE



RESUMEN	viii
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	1
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	15
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Obtención células dendríticas	17
Determinación expresión deIDO	18
Determinación de la concentración de quinurenina del medio	19
Determinación de la concentración de proteína por Western Blot	20
RESULTADOS	21
Obtención células dendríticas	21
Determinación expresión deIDO	21
Determinación de la concentración de quinurenina del medio	25
Determinación de la concentración de proteína por Western Blot	27



DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES	37
REFERENCIAS	39
TABLAS O CUADROS	
Tabla 1: Programa funcional y competencia de IDO en DCs murinas	7
FIGURAS	
Figura 1: Integración de señales por las DCs	2
Figura 2: Regulación de la expresión y actividad de IDO	3
Figura 3: Mecanismo de inhibición de linfocitos T por células IDO competentes	10
Figura 4: Vía de las quinureninas	11
Figura 5: Modelo de comunicación cruzada entre células dendríticas (DCs) y células T	12
Figura 6: “Dot plot” representativo de un cultivo celular de células dendríticas (DCs)	22
Figura 7: Evaluación de la expresión del gen <i>Indo</i>	23
Figura 8: Análisis densitométrico de la expresión relativa del gen <i>Indo</i>	24
Figura 9: Análisis de la expresión proteica de la enzima IDO	26
Figura 10: Curva estándar de quinurenina	29
Figura 11: Producción de quinurenina en DCs estimuladas con LPS	30

ABREVIATURAS

Ag	Antígeno
AR	Artritis reumatoide
APC	Célula presentadora de antígeno
BMDC	Células dendríticas derivadas de médula ósea
CD40	Proteína integral de membrana ligando para CD40L
CD80	Molécula coestimuladora B7-2 ligando para CTLA4
CD86	Molécula coestimuladora B7-2 ligando para CD28
CIA	Artritis inducida por colágeno tipo II
CII	Colágeno bovino tipo II
DCs	Células dendríticas
DCs/CII	Células dendríticas pulsadas con colágeno
GM-CSF	Factor estimulante de colonias granulocíticas y macrofágicas
HRP	“Horseradish-Peroxidase”
IFN- γ	Interferón gamma
IL-10	Interleuquina- 10
IL-12	Interleuquina- 12
LT	Linfocitos T
LPS	Lipopolisacarido
0hLPS/DCs	Células dendríticas sin estimular con LPS.
4hLPS/DCs	Células dendríticas estimuladas con LPS por 4 horas.
24hLPS/DCs	Células dendríticas estimuladas con LPS por 24 horas
Treg	Linfocitos T reguladores CD4+CD25+Foxp3+
TLR	Receptor tipo toll

RESUMEN

Las células dendríticas (DCs) constituyen un grupo heterogéneo de células presentadoras de antígenos profesionales que juegan un papel fundamental en la respuesta inmune innata y adquirida. Éstas tienen el potencial de promover tanto la inmunidad como la tolerancia *in vivo*. Se ha demostrado que el metabolismo del triptófano, específicamente la habilidad de degradar triptófano a quinurenina, podría determinar el fenotipo inmunológico de estas células. Recientemente en nuestro laboratorio se han obtenido DCs murinas que poseen ciertas características tolerogénicas, como lo son una alta secreción de citoquinas IL-10 y TGF- β , al ser maduras con lipopolisacárido (LPS) por 4 horas (4hLPS/DCs). Es más, estas células al ser inyectadas en ratones artríticos, fueron capaces de modular negativamente la enfermedad. Debido a estos antecedentes esta tesis se enfocó a determinar si el metabolismo del triptófano está involucrado o no en la habilidad supresora de las 4hLPS/DCs.

En este trabajo se estudió el rol del metabolismo del triptófano en la tolerancia inducida *in vivo* por 4hLPS/DCs. Para analizar el rol del metabolismo del triptófano se estudió la expresión del gen *Indo*, que transcribe la enzima Indoleamina 2,3 dioxigenasa (IDO), enzima que genera la primera reacción y limitante de la vía de las quinureninas, mediante transcripción reversa acoplada a reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). También se observó la cantidad de proteína de la enzima (IDO) mediante western blot. Por último, se generó un método mediante cromatografía líquida de alta eficiencia, por el cual pudimos determinar la concentración de quinurenina, metabolito del metabolismo del triptófano, a

partir de medio de cultivo de estas células, y así determinar la producción de quinurenina, o actividad de la enzima IDO, en estas células.

Aquí demostramos que aunque el gen *Indo* es sobreexpresado en 4hLPS/DCs, esta sobreexpresión no se correlaciona ni con la cantidad de proteína ni con la actividad de ésta, ya que la cantidad de proteína y la producción de quinurenina no fue significativamente diferente en estas células, comparadas con DCs inmaduras, sin estimular con LPS (0hLPS/DCs), o completamente maduras, estimuladas por 24 horas con LPS (24hLPS/DCs). Pudimos demostrar que DCs derivadas de médula ósea son capaces de secretar quinurenina, refutando literatura sobre este tema, aunque los niveles detectados (0,3-0,5 μ M) son muy bajos para ser considerados inmunológicamente relevantes. Se determinó que las células secretoras de quinurenina son en efecto las DCs, ya que no se detectó quinurenina en medios de cultivo de DCs no purificadas, ni en medios de células CD11c⁻, sólo se detectó en cultivos de células seleccionadas CD11c⁺.

En este estudio se estableció que el efecto inmunorregulador ejercido por 4hLPS/DCs, no estaría dado por el metabolismo del triptófano, y que el mecanismo de su inmunosupresión debe ser dilucidado en trabajo futuro, fuera del contexto de esta tesis.

ABSTRACT

Dendritic cells (DCs) constitute a heterogenic group of professional antigen presenting cells (APCs) that play a key role in the immune response, both innate and adaptive. These cells have the potential to promote both immunity and tolerance *in vivo*. It has been proven that tryptophan metabolism, specifically the ability to transform tryptophan to kynurenine, can determine the immune phenotype of these cells. Recently in our laboratory we have obtained murine DCs with tolerogenic characteristics, like high secretion of the cytokines IL-10 and TGF- β , by maturing these cells with lipopolysaccharide (LPS) for 4 hours (4hLPS/DCs). Moreover, these cells when injected in arthritic mice, were capable of negatively modulating the disease. With this background this work focused on establishing if tryptophan metabolism is involved on the suppressive properties of the 4hLPS/DCs.

In this work we studied the role of tryptophan metabolism in the tolerance induced *in-vivo* by the 4hLPS/DCs. For this we studied the expression of the gene *Indo*, gene that transcribes the enzyme Indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) that generates the first and limiting reaction of the kynurenine pathway, by reverse transcription attached to the polymerase chain reaction (RT-PCR). We also observed the amount of protein IDO by western blot. Finally we generated a method of high performance liquid chromatography that allowed us to determine the amount of kynurenine, metabolite of the tryptophan metabolism, from the culture medium of DCs, permitting us to determine the production of kynurenine and thus, activity of IDO in these cells.

Here we demonstrated that although the gene *Indo* is overexpressed in 4hLPS/DCs, this overexpression doesn't correlate with the amount of protein nor with the activity of the enzyme, because the amount of protein and the production of kynurenine were not significantly different in these cells compared with the unstimulated DCs (0h/LPS/DCs), or the cells stimulated for 24 hours with LPS (24h/LPS/DCs).

We were able to determine that the DCs derived from bone marrow are capable of producing and secreting kynurenine, contradicting literature about this subject, although the levels detected (0,3-0,5 μ M) are too low to be considered immunologically relevant. We establish that the cells that secrete kynurenine were in fact DCs, because no kynurenine was detected in cultures of unpurified DCs or culture of CD11c⁻ cells, we only detected kynurenine in cultures of CD11c⁺ cells.

In this study we established that the tolerance generated by the 4hLPS/DCs *in-vivo*, is not generated by the tryptophan metabolism, and that the mechanism for the immune suppression of this cells remains to be established outside the context of this thesis.

INTRODUCCIÓN

El sistema inmune tiene la función de proteger al organismo de entidades patogénicas tanto externas como internas. Los mecanismos que usa el sistema inmune para determinar que es patogénico y que no, no han sido completamente dilucidados. Lo que se sabe es que dependiendo del contexto en que ocurre la presentación de antígenos por una célula presentadora de antígenos (APC) a linfocitos T, el resultado inmunológico puede llevar a tanto a inmunidad como a tolerancia. Dentro de las APCs, las células que han cobrado mayor relevancia son las células dendríticas (DCs), debido a su especialización en presentación antigénica y su habilidad de dar señales que puedan cambiar el tipo de respuesta hacia el antígeno que es presentando (Banchereau y col, 2000).

Las DCs constituyen un grupo heterogéneo de APCs, que derivan de múltiples linajes y pueden encontrarse en distintas etapas de desarrollo o activación. Éstas tienen el potencial de promover tanto la inmunidad como la tolerancia *in vivo*, como también en distintos modelos experimentales (Moser 2003).

Aunque todas las DCs derivan de precursores de médula ósea, rápidamente se diferencian en distintos linajes que le dan a las diversas DCs sus características específicas. Las DCs pueden ser aisladas de sangre u órganos linfoides, o pueden ser generadas *in-vitro* desde precursores hematopoyéticos. El fenotipo inmunogénico o tolerogénico de las DCs depende de la subpoblación a que pertenece, estado de maduración y plasticidad funcional (Fig1) (Mellor & Munn 2004).

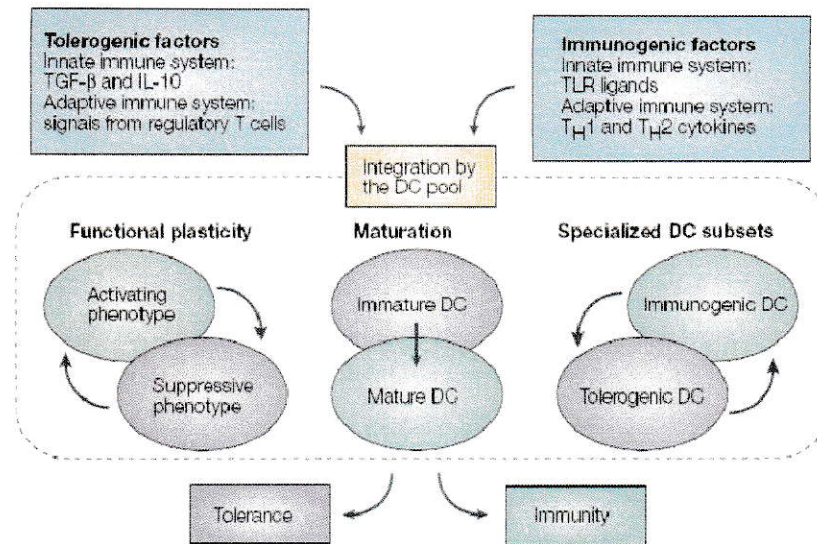


Figura 1: El pool heterogéneo de células dendríticas (DC) integra señales tanto del sistema inmune innato como adquirido, ambos sistemas contribuyen con señales que gatillan el resultado inmunológico, tanto para la tolerancia como para la inmunogenicidad. Figura obtenida de Nature Reviews Immunology 2004 4: 762-774.

Se considera DCs inmunogénicas a células con alta expresión de moléculas co-estimuladoras (CD86, CD80, CD40), alta expresión de la citoquina inflamatoria interleuquina-12 (IL)-12 y la habilidad de expandir a linfocitos T (LT) efectores. Las DCs tolerogénicas tienen la habilidad de promover apoptosis o anergia de células T efectoras y/o expandir o generar células reguladoras naturales (Treg). Se caracterizan por tener una baja expresión de moléculas co-estimuladoras, baja expresión de IL-12, alta producción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10, y recientemente descrito, actividad de la enzima indoleamina 2,3- dioxigenasa (IDO) (Mellor, 2005).

IDO es una enzima que degrada el anillo indol del triptófano, serotonina y melatonina, e inicia la producción de metabolitos inmunoreguladores, conocidos colectivamente como quinureninas. Además de IDO, existe otra enzima que cataliza la misma reacción y limitante de la vía de las quinureninas, llamada triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO) (Mellor & Munn 2004). La expresión de TDO está principalmente confinada al hígado, siendo constitutiva y no es regulada por señales del sistema inmune. En tanto, IDO es expresada por diversos tipos celulares y tanto su expresión como actividad se encuentran bajo una compleja regulación por señales inmunológicas (Fig2) (Mellor & Munn 2004).

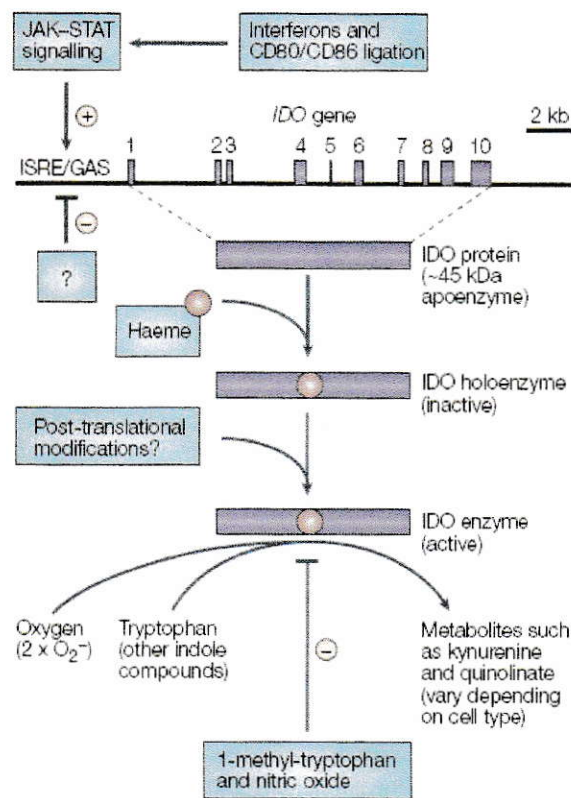


Figura 2: Los elementos de respuesta a la estimulación con interferon (ISREs) son inductores de la transcripción de la indoleamina 2,3- dioxigenasa (IDO). Aunque no se han descrito represores de la transcripción, se infiere que existen tanto represores cis como trans, debido a que la

inducción de IDO es del tipo celular específica. También se supone que existen modificaciones post traduccionales, que explicarían la existencia de la proteína inactiva. Además, existe una regulación al nivel funcional, dada por el ensamblaje con su grupo hemo, inhibiendo su sitio activo. Figura obtenida de Nature Reviews Immunology 2004 4: 762-774.

La proteína IDO es codificada por un gen con 10 exones, sobre una región de ~15kbp de DNA en el cromosoma 8 tanto en humanos como en ratón. La transcripción de este gen se encuentra muy controlada, respondiendo a señales inflamatorias y confinadas a un cierto tipo de células. El promotor de este gen, tanto en ratón como en humanos, contiene múltiples señales de respuesta a interferones tipo I (INF- α ; INF- β), y más fuertemente a interferones tipo II (IFN- γ) (Puccetti 2007). Por esto, varios tipos celulares expresan la proteína IDO luego de ser estimulados con IFN- γ . Sin embargo, esta enzima es transcrita sin actividad funcional y solo presenta actividad en pocos tipos celulares como las DCs CD8 α^+ y algunas líneas tumorales al ser estimuladas con IFN- γ (Heyes y col. 1997).

Creciente evidencia experimental confirma que el mecanismo IDO en DCs promueve la inmunosupresión de linfocitos T, tanto en humanos (Terness y col. 2006) como en ratón (Mellor y col. 2002; Mellor & Munn, 2003; Mellor & Munn, 2004). Además, DCs mieloides con inducción forzada de IDO también adquieren propiedades reguladoras (Yu y col. 2008).

En ratón se han identificado tres subgrupos de DCs con elevados niveles de expresión de CD11c (CD11c high): DCs CD8 α^+ , DCs CD4 $^+$ CD8 $^-$ y DCs CD4 $^-$ CD8 $^-$, presentes en bazo y ganglios linfáticos (Vremec y col. 2000). En condiciones normales las DCs CD8 α^+

constituyen entre el 20-30% de la población CD11c high, se encuentran en un estado de semi-maduración (expresión intermedia de moléculas co-estimuladoras como CD86) y residen en las áreas de linfocitos T, mientras que las poblaciones DCs CD8⁻ se encuentran inmaduras y residen principalmente en zonas marginales, migrando hacia las zonas T en respuesta a estimulación, sufriendo un proceso de maduración (Vremec y col. 2000).

Estas células al aislarlas presentan propiedades muy diferentes. Las DCs CD8⁺ son básicamente reguladoras, medida por su habilidad de generar apoptosis de linfocitos T *in-vitro*, son IDO competentes, ya que presentan la enzima con actividad funcional. Sus propiedades tolerogénicas son dependientes de la actividad de la enzima IDO, ya que tratando estas células con un inhibidor competitivo de la enzima, el 1 metil-triptofano (1-MT), pierden sus habilidades tolerogénicas (Fallarino y col. 2002).

Las DCs CD8⁻ por su parte, son básicamente inmunogénicas, no generan apoptosis de linfocitos T y no tienen actividad de la enzima IDO, medida por su habilidad de degradar el aminoácido triptófano. Es más, el tratamiento con IFN- γ , capaz de potenciar el programa tolerogénico de DCs CD8⁺ de una forma dependiente de IDO, es incapaz de modificar la función inmunogénica de las células CD8⁻ (Grohmann y col. 2000). A pesar que la expresión del gen de IDO (*Indo*) es estimulada por IFN- γ en ambas subpoblaciones de DCs, y que se vio un aumento considerable en la cantidad de la enzima en ambos linajes luego del tratamiento con IFN- γ , solo las DCs CD8⁺ presentan la actividad de esta enzima, medida por su habilidad de degradar triptófano a quinurenina (KYN) (Fallarino y col. 2002). Posteriormente, se ha observado que la actividad IDO en

las DCs CD8 α ⁻ es inducible, mediante su exposición a inmunoglobulina-CTLA4, una forma soluble del ligando de las Tregs, o a Tregs directamente (Fallarino y col. 2003).

En una serie de experimentos, resumidos en la Tabla 1, obtenida de Blood 2006 107: 2846-2854 (Orabona y col, 2006), se concluye que tanto citoquinas como receptores influyen en el resultado inmunológico de estas DCs. CTLA-4 es capaz de revertir la actividad basalmente inmunogénica de DCs CD8 α ⁻ y potenciar actividad reguladora en CD8 α ⁺ in-vitro al unirse a los receptores B7 (CD80; CD86) en las DCs (Orabona y col. 2006; Mellor y col. 2004), y es capaz de revertir el rechazo inmunológico in-vivo al ser inyectado en ratones en forma soluble CTLA-4-Ig (Grohmann y col. 2002), mientras que el receptor CD28 al unirse a los mismos receptores B7 genera un resultado opuesto, confiriendo inmunogenicidad a las DCs CD8 α ⁺. Similarmente, las citoquinas tales como IFN- γ e IL-6, confiere propiedades tolerogénicas e inmunogénicas, al activar ó inhibir la actividad deIDO, respectivamente.

Table 2. Functional program and IDO competence of murine CD8⁻ and CD8⁺ DCs subjected to different types of treatment

Type of treatment	In vivo outcome	IDO competence	References
CD8⁻ DC subset			
None	Immunity	-	Grohmann and colleagues, ^{9,10} Orabona et al ²²
IFN- γ	immunity	-	Grohmann et al, ¹² Fallarino et al ¹³
IL-6	Immunity*	-	Orabona et al ²²
CTLO-4-Ig	Tolerance	+	Grohmann et al, ⁹ Fallarino et al, ¹⁵ Orabona et al ²²
CD28-Ig	immunity*	-	Orabona et al ¹¹
CD8⁺ DC subset			
None	Tolerance	-	Grohmann and colleagues, ^{9,10} Orabona et al ²²
IFN- γ	Tolerance†	+	Grohmann and colleagues, ^{10,12} Fallarino et al ¹³
IL-6	Immunity	-	Grohmann et al, ¹⁰ Orabona and colleagues ^{22,27}
CTLO-4-Ig	Tolerance†	+	Orabona et al ²²
CD28-Ig	immunity	-	Orabona and colleagues ^{11,22}

Data were compiled from several publications (indicated).

- indicates negative; +, positive.

*IL-6 and CD28-Ig reinforce the immunogenic potential of CD8⁻ DCs, thus allowing these cells to overcome the immunosuppressive properties of untreated CD8⁺ DCs.

†IFN- γ and CTL0-4-Ig reinforce the tolerogenic potential of CD8⁺ DCs, thus allowing these cells to overcome the enhanced stimulatory capacity of CD8⁻ DCs treated with IL-6.

Además, se ha observado que la unión del ligando de CD40 (CD40L) a CD40 en las DCs, también afecta el metabolismo del triptófano y con él, las propiedades inmunológicas de las DCs, teniendo un efecto antagónico con el receptor CTLA-4 (Grohmann y col. 2003a). La unión de CD40L a CD40 gatilla la producción de elevadas cantidades de IL-6 por las DCs, citoquina que reprime la actividad de la enzima IDO, confiriendo inmunogenicidad a estas células (Grohmann y col. 2001b). Además, se pudo establecer que la unión de CD40L a CD40 induce la transcripción de la enzima IDO en DCs, pero a su vez IL-6 reprime su actividad. Se cree que la expresión de IDO por CD40L se debe a un posible mecanismo inhibitorio de las DCs cuando están en un

ambiente con un gran número de linfocitos activados expresando CD40L. Así, este mecanismo protegería de una posible sobre estimulación (Hwu y col. 2000).

Esta serie de experimentos ha puesto de manifiesto que las DCs son capaces de adquirir señales a partir de sus moléculas co-estimuladoras. Estas moléculas se han estudiado principalmente por su función de activar a los linfocitos T, pero ahora es claro que hay una señalización bidireccional, comúnmente llamada señalización reversa.

Esta señalización reversa se refiere a una cascada de señales gatillada por la unión de receptores en la DC con sus ligandos en los linfocitos T. Ésta se ha visto gatillada por la unión de CD40 con CD40L, los receptores B7 (CD80; CD86) con CTLA-4 y también con la unión de GITRL en la DC por GITR en linfocitos T (Puccetti & Grohmann 2007; Grohmann y col. 2007; Munn y col. 2004), esta última señalización reversa también activando a IDO. A este último evento, se le atribuye actualmente como el mecanismo por el cual los glucocorticoides generan inmunosupresión, ya que éstos inducen la expresión de ambos correceptores, tanto de GITRL en la DC como de GITR en linfocitos T (Grohmann y col. 2007).

La transducción de señales responsable de esta señalización reversa se le conoce como activación no-canónica de NF- κ B, en la cual se produce translocación al núcleo del activador transcripcional p52-REL-B y no de p50-REL-A, como lo sería en la vía clásica o canónica. En el núcleo p52-REL-B es responsable de la transcripción de varios genes que inducen un fenotipo tolerogénico en las DCs, entre ellos la enzima IDO.

Con esta evidencia se postula que el mecanismo IDO es un mecanismo central en la generación de tolerancia periférica, capaz de auto mantenerse gracias a la señalización

reversa mediada por linfocitos T reguladores que expresan CTLA-4 y/o GITR. Además, ligandos como CD40L en linfocitos T activados activan el mecanismo IDO en DCs, lo que permite una retroalimentación negativa entre los linfocitos T activados y las DCs, indispensable para el balance inmunológico (Mellor & Munn 2008; Morelli & Thomson, 2007; Tas y col. 2007). El mecanismo no es simple, todos los factores que estimulan la señalización reversa o activación no canónica de NF- κ B, también activan la vía canónica de NF- κ B, la cual genera la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6 que inhibe la actividad de IDO (Hayden & Ghosh 2004). Hasta el momento no se sabe con seguridad que otros factores pueden estar afectando la inducción de una u otra vía en las DCs.

Además de IFN- γ , se ha demostrado que otros compuestos pro-inflamatorios estimulan la expresión de *Indo*, como es el lipopolisacárido (LPS) y polyI:C, así como también citoquinas pro-inflamatorias como factor de necrosis tumoral (TNF) e IL-1 (Babcock & Carlin, 2000; Robinson y col. 2003; Fallarino & Puccetti 2006; Fujigaki y col. 2006; McIlroy y col. 2005), sin embargo, son incapaces por sí solos de activar el mecanismo IDO.

El mecanismo por el cual las DCs IDO competentes generan inmunosupresión son dos, la *privación de triptófano* y la *producción de quinureninas inmunoreguladoras*. La actividad de la enzima consume el aminoácido esencial triptófano, que es censado por los linfocitos T al encontrarse la triptofanil-tRNA sin su aminoácido, esto genera señales de estrés que llevan a la anergia o apoptosis de los linfocitos T (Fig. 3) (Mellor & Munn 2004). Además, los compuestos río abajo, o llamados colectivamente quinureninas,

ejercen un rol directo en los linfocitos T, llevándolos a anergia o apoptosis (Belladonna y col. 2006).

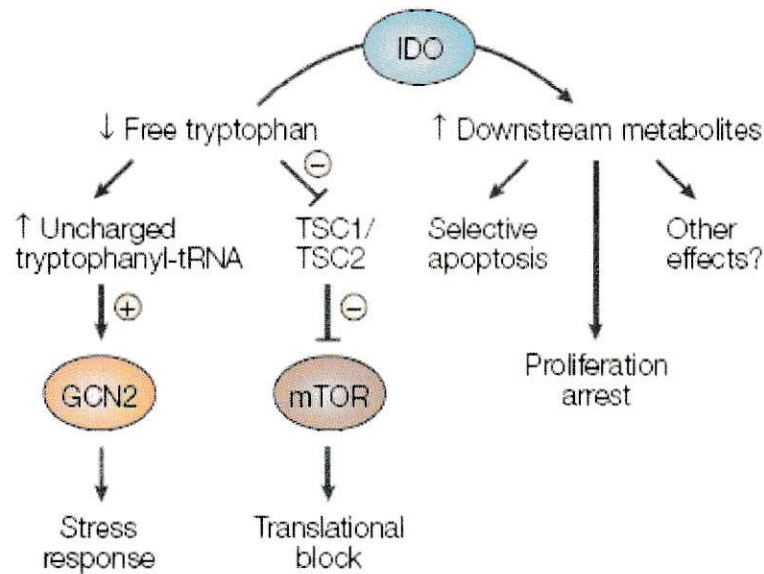


Figura 3: Mecanismos potenciales de inhibición de células T por células indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) competentes. El aumento de las moléculas río abajo, llamadas quinureninas genera directamente la anergia de linfocitos T, aunque el mecanismo por el cual generan este efecto se desconoce. Además, se ha detectado que disminuye la concentración del aminoácido esencial triptófano, lo cual genera mecanismos de estrés en los linfocitos T que llevan a la anergia y arresto del ciclo celular. Figura obtenida de Nature Reviews Immunology 2004 4: 762-774.

En un análisis de “microarray” se demostró que las DCs humanas, derivadas de monocitos, regulan conjuntamente la expresión de *Indo* y otros genes de la vía de las quinureninas (McIlroy y col. 2005), como son los genes *Kmo*, *Kynu* e *Haa0* (Fig 4) (Belladonna y col. 2006).

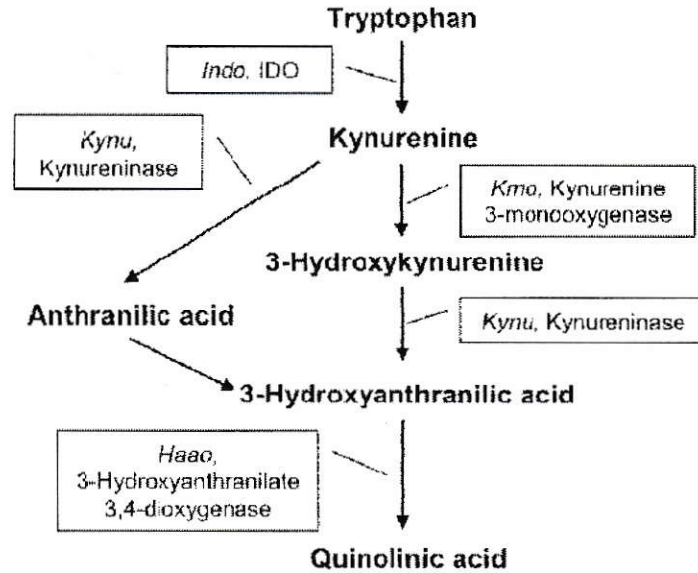


Figura 4: Vía de las quinureninas en células de mamíferos. La indoleamina 2,3- dioxigenasa (IDO) cataliza la primera reacción y limitante de la vía que lleva a la producción de metabolitos inmunológicamente relevantes. Figura obtenida de The Journal of Immunology 2006 177: 130-137.

Esto es relevante, dado que se ha demostrado que las DCs que no poseen IDO funcional, expresan las enzimas necesarias para continuar con la vía metabólica río abajo.

Estas células pueden adquirir un fenotipo tolerogénico a través de la producción paracrina de quinureninas por DCs IDO competentes (Belladonna y col. 2006). Incluso, se ha demostrado que una mínima población de DCs que expresan IDO pueden generar una inmunosupresión sistémica *in vivo* (Munn y col. 2004; Grohmann y col. 2000). (Fig. 5) (Belladonna y col. 2006).

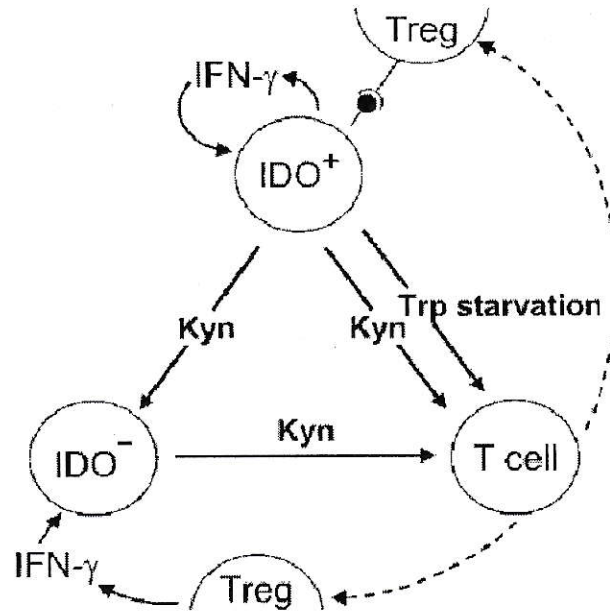


Figura 5: Modelo de comunicación cruzada entre células dendríticas (DCs) y células T. Células indoleamina 2,3- dioxigenasa (IDO) competentes (IDO⁺) por la activación con interferon gamma (IFN-γ) degradan triptófano y secretan quinurenina y metabolitos río debajo de la vía. Estos metabolitos (quinureninas) confieren habilidad inmunosupresora a DCs IDO incompetentes (IDO⁻) que tienen suprimida la actividad de IDO, pero no del resto de las enzimas de la vía. Los linfocitos reguladores naturales (Tregs) son muy importantes en generar un microambiente rico en IFN-γ mediante unión CTLA-4 con el receptor B7 en DCs. También se sabe que en ambiente rico en quinureninas y bajo en triptófano se generan Tregs a partir de linfocitos T CD4⁺ vírgenes, por lo que se podría formar un circuito de retroalimentación positiva gatillada por IDO. Figura obtenida de The Journal of Immunology 2006 177: 130-137.

Esto se debe a que IFN-γ induce la transcripción de todas las enzimas de la vía de las quinureninas en ambas subpoblaciones CD8α⁺ y CD8α⁻, pero la enzima IDO posee estricta regulación de su actividad, por lo que sólo se encuentra activa en las células IDO competentes, que son las CD8α⁺. Sin embargo, esta es la única enzima que tiene su actividad regulada, mientras el resto de la vía se encuentra activa en ambos linajes

(Belladonna y col. 2006). De esta forma, al suministrar a células IDO incompetentes, estimuladas con IFN- γ , con quinurenina, metabolito río abajo de la vía de IDO, es capaz de ser metabolizado, confiriendo propiedades inmunosupresoras a estas células IDO incompetentes (Belladonna y col. 2006).

Las enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (AR) se caracterizan por inflamación crónica debido a una desregulación del sistema inmune. Con el fin de estudiar estas enfermedades se han generado varios modelos animales de la enfermedad, siendo uno el modelo murino de artritis inducida por colágeno (CIA). Luego de la inoculación de colágeno bovino tipo II (CII), los animales presentan una alta producción de auto-anticuerpos y destrucción crónica de las articulaciones sinoviales. Al igual que en la AR, CIA se ha asociado a una presentación antigénica desregulada por parte de las DCs a los linfocitos T, a través del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC CII).

Recientemente, en nuestro laboratorio se han obtenido DCs murinas derivadas de médula ósea (BMDC), las cuales poseen ciertas características tolerogénicas. Estas fueron maduras con LPS por 4 horas, obteniendo un fenotipo semi-maduro con expresión intermedia de moléculas de MHC de clase II, CD86 y CD40, vale decir, más baja que DCs estimuladas con LPS por 24 horas (maduras) y mayor que DCs no estimuladas (inmaduras). Estas DCs mostraron tener una elevada secreción de IL-10 y baja secreción de IL-12, IL-6 y TNF. Adicionalmente, estas DCs al ser inyectadas a ratones con CIA establecida, generan una disminución en la progresión de la

enfermedad, sólo cuando se encuentran cargadas con CII (Salazar y col. 2007; Salazar y col. 2008).

De acuerdo al protocolo por el cual fueron generadas las DCs descritas, no deberían expresar el marcador CD8 α , por lo que serían CD8 α ⁻ (Weigel y col. 2002). En resultados preliminares se ha visto que las DCs estimuladas por cortos períodos con LPS generan una sobreexpresión del gen *Indo*, determinado por RT-PCR. Lo anterior, pudiera indicar que el mecanismo tolerogénico de estas DCs pudiera deberse a la producción de quinureninas inmunoregulatoras por estas DCs.

HIPÓTESIS

Las células dendríticas semi-maduradas por cortos estímulos con lipopolisacárido efectúan su actividad inmunoreguladora por el mecanismo de IDO. Ello debido a que estas células dendríticas o tendrían el mecanismo IDO activo antes de ser inyectadas, expresando la enzima IDO activa y secretando el metabolito inmunoregulador quinurenina, o bien, las células dendríticas activarían su metabolismo del triptófano una vez inyectadas, por lo que tendrían una elevada cantidad de proteína IDO inactiva, que se activaría *in-vivo* por otras moléculas tales como IFN- γ , CTLA-4 u otra.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el papel del metabolismo del triptófano en la capacidad tolerogénica de células dendríticas mieloide murinas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Generar células dendríticas maduras con estímulos de 0, 4, y 24 horas con lipopolisacárido y analizar su fenotipo mediante citometría de flujo.
2. Evaluar la expresión del gen *Indo* en estas condiciones mediante PCR semi-cuantitativo.
3. Evaluar la secreción y metabolización de quinurenina por células dendríticas maduras con distintos tiempos de estimulación con lipopolisacárido, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.
4. Evaluar a nivel de proteína por la técnica de western blot, la concentración de IDO a los distintos tiempos de estimulación con lipopolisacárido.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención de células dendríticas:

Las DCs fueron generadas a partir de precursores de médula ósea de ratones DBA/lacJ. Brevemente. Los precursores de médula ósea fueron obtenidos de fémures y tibias de ratones, de entre 8 a 10 semanas, mediante extracción por perfusión con jeringa. Luego las células fueron lavadas 2 veces con buffer fosfato salino (PBS), contadas y plaqueadas a 1×10^6 células/ml en medio RPMI suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB) en presencia de factor estimulante de colonias granulocíticas y macrofágicas (GM-CSF) a la concentración $1 \mu\text{g}/\text{mL}$. Al día 3 de cultivo se removió cuidadosamente la mitad superior del medio, de modo de no remover las células adherentes. El medio de cultivo se reemplazó con igual volumen de medio fresco suplementado. Al día 6 de cultivo se sacó todas las células empleando un “cell scrapper”, las que fueron lavadas dos veces con medio, procediendo a su plaqueo a una concentración de 1×10^6 células/mL en placas con medio suplementado. Luego se estimuló diferencialmente las células con $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS *Escherichia coli* (Sigma) por 24 horas (DCs completamente maduras) (24hLPS/DCs), mientras que las DCs de corto estímulo con LPS (4hLPS/DCs), al día 7, fueron estimuladas con LPS por 4 horas, antes de ser cosechadas. Paralelamente se dejó DCs sin estimular con LPS. Estas células se obtuvieron con “cell scrapper” y fueron lavadas con PBS para su posterior uso.

Para las mediciones de sobrenadante por HPLC fue necesario purificar las células dendríticas. Las células utilizadas fueron purificadas al día 7 de iniciado el cultivo,

mediante esferas magnéticas acopladas al marcador de linaje de DCs, CD11c (MACS, Miltenyi Biotec, Germany). La purificación se lleva a cabo en columnas de separación MACS LS (Miltenyi Biotec, Germany), sujetas al magneto del sistema de purificación MidiMACS (Miltenyi Biotec, Germany), quedando retenidas en la columna las células positivas para CD11c (CD11c⁺). De esta manera las células obtenidas corresponden a aproximadamente 89% DCs verificado por citometría de flujo.

2. Determinación de la expresión deIDO:

El ARN de DCs diferencialmente estimuladas y de controles, fue obtenido de 5×10^6 células mediante la extracción de ARN con Trizol®. Las células fueron pipeteadas con Trizol® hasta ser completamente homogénea la solución. Luego el homogenizado se guardó a -80°C hasta ser usado. La extracción se continuó siguiendo el protocolo Trizol® y el ARN se cuantificó por su absorbancia a 260nm, usándose 5µg para evaluar la calidad de éste en un gel de agarosa al 1.5% en buffer no desnaturante MOPS. Para la reacción de la transcriptasa reversa y generación de cADN, se usó 1µg de ARN. Los ADN se conservaron a -20°C hasta ser posteriormente usados. Los análisis de RT-PCR se hicieron siguiendo el protocolo de 32 ciclos a temperatura de “annealing” de 60°C para el amplificado de IDO, utilizando los partidores “sense” 5'-AGTGGAGTAGACAGCAATGGC-3' y “antisense” 5'-AAGACAGAATAGGAGGCAGGC-3' que generan un amplificado de 404pb.

Para el amplificado de β -actin la reaccion fue de 30 ciclos con temperatura de “annealing” de 55°C. Se utilizaron los partidores “sense” 5'- ATTGAACATGGCATTG -3' y “antisense” 5'- TGCTGGTCTCCGTATGTCC -3', dando un amplificado de 231pb. Los primers fueron diseñados utilizando el software OligoExplorer1.2 y sintetizados por Genexpress. Los productos de amplificación fueron cargados a un gel de agarosa al 1% y sus respectivos tamaños fueron confirmados con un “ladder” de ADN de 100pb (Promega). Las imágenes fueron analizadas por el software ImageJ.

3. Determinación de la concentración de quinurenina por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC):

Las células fueron lavadas y re-cultivadas en medio RPMI suplementado con SFB al 10% por 24 horas. Luego, el medio obtenido fue filtrado (membrana de 0,2nm) y guardado a -80°C hasta ser analizado en HPLC.

Para determinar la concentración de quinurenina se estableció un método a través de HPLC. Brevemente, la fase móvil utilizada consistió en una mezcla de acetonitrilo : agua bidestilada a 150:850 vol/vol con 100 μ L de acido trifluoroacetico (TFA), con un pH cercano a 3. La columna empleada fue columna Luna C18(2) de 100A medidas 250 x 4,6mm y de 5 micrones. La separación cromatografica se observo a 242nm, 0,018 de absorbancia a un flujo de 1ml/min. El volumen de muestra inyectado fue de 50 μ l, a través de un “loop” de ese volumen. El ciclo total entre inyecciones fue de 14 minutos. La información fue adquirida y procesada por un “HP ChemStation data acquisition system” (Hewlett-Packard 1990 - 1998).

Se generó una curva estándar de quinurenina inyectando soluciones de concentración conocida de quinurenina (Sigma) en metanol : agua (10:90). Luego las muestras fueron interpoladas en la curva estándar dando su concentración.

4. Determinación de la concentración de proteína por Western Blot:

DCs fueron lavadas en PBS y lisadas con buffer RIPA con inhibidor de proteasas. La concentración de proteína se midió por método de Bradford usando una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) en “buffer” RIPA. Luego, 25µg de proteína fueron cargados a un gel de poliacrilamida al 15% en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS), resolviéndose el gel a 80V. Posteriormente se realizó electro-transferencia a una membrana de nitrocelulosa a un voltaje de 100V por 1 hora. La membrana se bloqueó con leche descremada al 5% en PBS-Tween al 1% toda la noche. Luego la membrana fue cortada, incubándose el fragmento superior con un anticuerpo policlonal anti-IDO (M-80 de Santa Cruz Biotechnology código: sc-25809) a una dilución de 1:1000. El fragmento de nitrocelulosa inferior fue incubado con un anticuerpo policlonal contra Histonas (H2A de Millipore código: 07-146) a una dilución de 1:2000. Al cabo de 2 horas de incubación a 37°C, ambas membranas fueron lavadas con PBS-Tween. Luego fueron incubadas con un anticuerpo secundario policlonal anti-IgG de conejo, conjugado a “horseradish peroxidase” (HRP) (Cell Signaling código: 7074) por 1 hora a temperatura ambiente a dilución de 1:2000, para finalmente revelar por quimioluminiscencia utilizando el reactivo SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (PIERCE, Rockford, IL, USA).

RESULTADOS

1. Obtención de células dendríticas:

Las células dendríticas (DCs) fueron obtenidas a partir de medula ósea murina y diferenciadas en presencia de GM-CSF. Su fenotipo fue evaluado al día 7 de cultivo, a través de citometría de flujo. Mediante el análisis de expresión del marcador de superficie CD11c, propio de las DCs, se pudo establecer un 30% del total de células adquiridas correspondió a DCs (Figura 6). Este porcentaje no varió en las células estimuladas con LPS ya sea por 4 o por 24 horas, por lo que se asume para el resto de los experimentos que se trabajó con porcentajes de DCs cercanos a este valor y que las diferencias observadas se deben a características intrínsecas de las DCs y no a cambios en el porcentaje de éstas.

2. Determinación de la expresión deIDO

En orden de determinar si la expresión de IDO en las DCs se ve influenciada por los estímulos diferenciales con LPS, analizamos la cantidad relativa de transcrito mRNA específico de esta enzima, en preparaciones de DCs estimuladas por 4 y 24 horas con LPS. DCs sin estimular fueron usadas como control. Primero se procedió a corroborar la calidad de RNA obtenido, a través del análisis de sus bandas ribosomales características de 28S y 18S (Figura 7A). Posteriormente, se analizó la expresión del gen *Indo* mediante RT-PCR usando partidores específicos, esta expresión se comparó con la de un gen

“housekeeping”, que en nuestro caso se trató de β -actina (Figura 7B). La expresión de *Indo* se evaluó mediante normalización respecto de la expresión de β -actina para las DCs sin estimular, o estimuladas por 4 y 24 horas con LPS. Normalizando respecto a la intensidad obtenida para las células sin estimular, pudimos determinar cómo afectan los distintos tiempos de estimulación con LPS la expresión de este gen (Figura 8). De este modo, pudimos establecer que tanto las DCs sin estimular (0hLPS/DCs) como aquellas estimuladas por 4 h con LPS (4LPS/DCs), expresan significativamente una mayor proporción de *Indo* que las DCs estimuladas por 24 h con LPS (24hLPS/DCs) $p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente. En tanto las 4hLPS/DCs expresaron significativamente una mayor proporción de *Indo* que las 0hLPS/DCs ($p < 0,05$) y que las 24hLPS/DCS ($p < 0,01$).

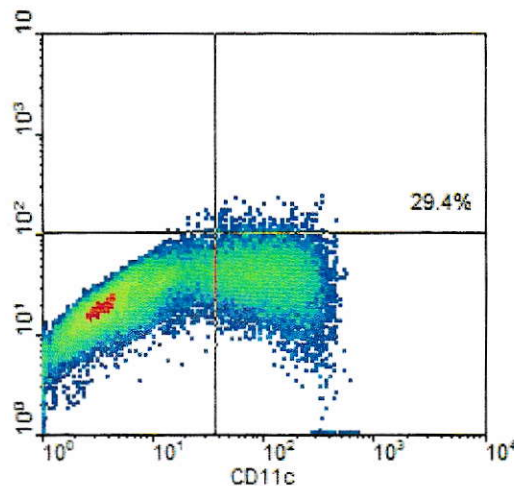


Figura 6: “Dot plot” representativo de un cultivo celular enriquecido en células dendríticas (DCs). Las DCs fueron individualizadas por citometría de flujo a través del marcador de superficie CD11c. 1×10^6 células fueron tratadas con un anticuerpo monoclonal anti- CD11c

conjugado a ficoeritrina (PE) a una dilución de 1:100. Las células fueron adquiridas por citometría de flujo utilizando un equipo FACSCalibur y el programa Cell Quest, mientras para el análisis se empleó el programa WinMdi 2.9. Las células obtenidas al día 7 de cultivo se caracterizaron por contener ente un 25 a 30% de una población CD11c⁺.

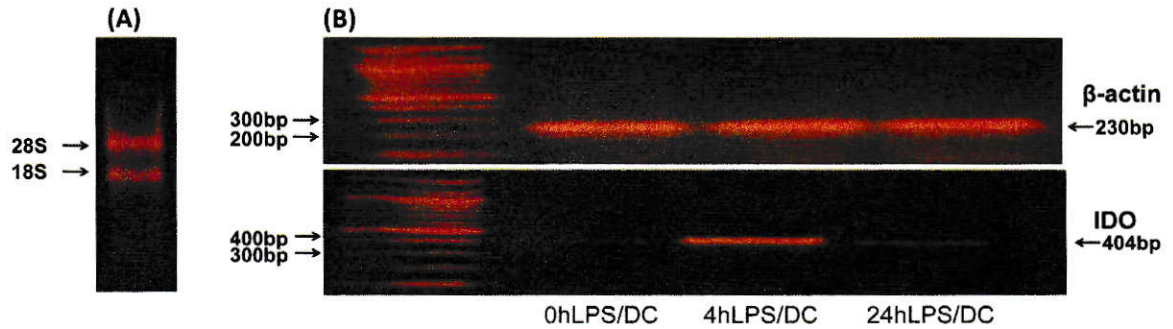


Figura 7: Evaluación de la expresión del gen *Indo* que codifica la enzima indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) a través de RT-PCR, en una preparación de células dendríticas estimuladas diferencialmente con lipopolisacárido (LPS). A) Se observan dos bandas características de RNA ribosomal 28S y 18S, asimismo se descarta la posibilidad de contaminación con ADN, que sería reconocido en forma característica debido a su gran tamaño. B) Muestra los fragmentos de amplificación, luego del PCR, los cuales se corrieron en un gel de agarosa al 1% y sus tamaños se confirmaron con un patrón molecular de tamaño conocido. El amplificado para β -actina y de IDO coinciden con tamaños esperados de 231pb y 404pb, respectivamente.

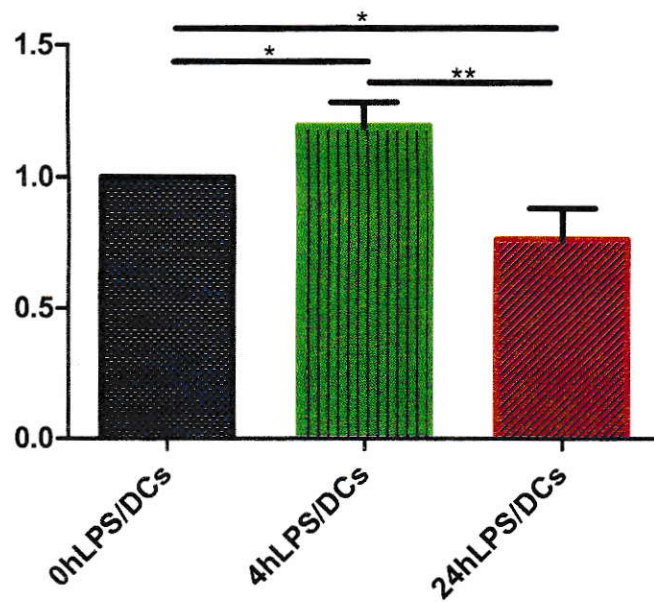
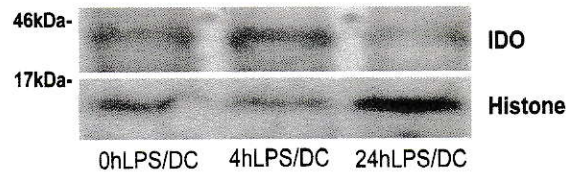


Figura 8: Análisis densitométrico de la expresión relativa del gen *Indo* que codifica la enzima indoleamina 2,3- dioxigenasa (IDO) mediante RT-PCR en una preparación de células dendríticas estimuladas diferencialmente con lipopolisacárido (LPS). Los fragmentos de amplificación fueron analizados por densitometría con el software ImageJ. Los datos de IDO se dividieron con los de β -actina para cada muestra dando la razón IDO/ β -actina para cada condición. Luego estos datos se normalizaron para células sin estímulo (0hLPS/DCs). La figura es representativa de tres experimentos realizados en forma independiente. El análisis estadístico utilizado fue una prueba de ANOVA de 1 vía para determinar diferencias significativas entre las tres columnas.

3. Determinación de la concentración de proteína IDO por Western Blot

Aunque la medición de la expresión de RNA aporta mucha información respecto a la expresión del gen *Indo*, ello no constituye una medida directa de la cantidad de enzima. Por ello, se planteó la necesidad de evaluar la concentración de la proteína IDO, con el fin de determinar si ésta se correlacionaba con el perfil de expresión de *Indo*, frente a cada estímulo de LPS. Para este propósito, usando el buffer RIPA, se procedió a la extracción de las proteínas totales de las DCs sin estimular y estimuladas por 4 y 24 horas con LPS, estas posteriormente fueron cargadas en un gel de poliacrilamida y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana luego fue incubada con anticuerpos específicos para las proteínas Ido e histonas, esta última como proteína control “housekeeping”. Las bandas reveladas, coincidieron con los tamaños moleculares esperados para cada una de las proteínas analizadas (Figura 9A), las cuales fueron analizadas por densitometría y la concentración de Ido fue normalizada con respecto a la de histona. Estas razones luego se normalizaron con respecto a las DCs sin estimular para determinar el efecto del estímulo de LPS en la concentración de IDO (Figura 9B). Aunque la concentración de IDO es levemente superior en 4hLPS/DCs con respecto a 0hLPS/DCs y 24hLPS/DCs, ésta diferencia no es significativa ($p > 0.05$). Lo anterior indica que la expresión de mRNA de IDO no correlacionó con la cantidad de proteína traducida, lo cual por tanto no explicaría el fenómeno inmunoregulatorio observado en DCs estimuladas diferencialmente con LPS.

(A)



(B)

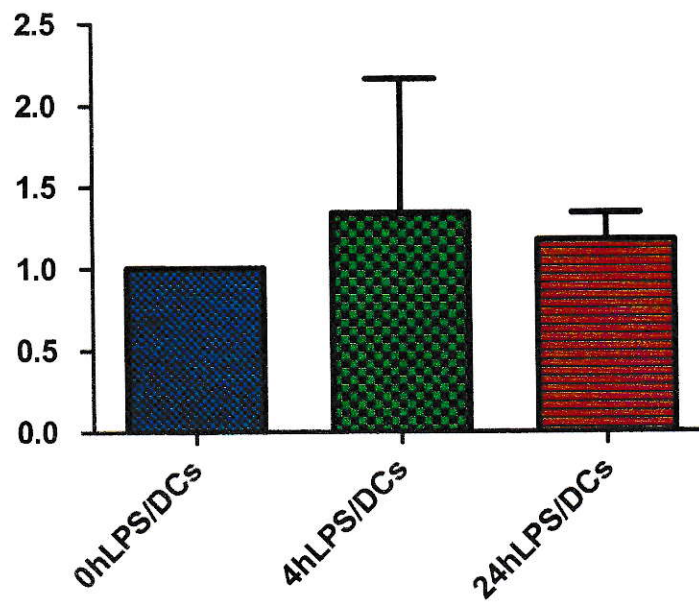


Figura 9: Análisis de la expresión proteica de la enzima indoleamina 2,3- dioxigenasa (IDO) en células dendríticas (DCs) murinas estimuladas diferencialmente con lipopolisacárido (LPS), mediante western blot. A) Se procedió a cargar 20 μ g de proteínas extraídas con buffer RIPA desde DCs sin estimular y estimuladas por 4 y 24 horas con LPS, en un gel de poliacrilamida. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, la que luego fue incubada con anticuerpos específicos contra IDO e histonas (housekeeping protein). Las bandas detectadas coincidieran con los pesos moleculares esperados, 45 kDa para IDO y 14 kDa para histona. B) Cuantificación de las bandas del western blot. Las bandas obtenidas de tres experimentos independientes se analizaron por densitometría utilizando el software ImageJ. Los valores obtenidos por densitometría para la cantidad de proteína IDO se dividieron para la cantidad de

histona de la misma muestra, obteniendo la razón IDO/histona. Luego estos valores se normalizaron para la razón IDO/histona de las células sin estimular (0hLPS/DCs) de cada experimento.

4. Determinación de la concentración de quinurenina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La evaluación de la actividad enzimática de IDO se realiza a través de la cuantificación de quinurenina, el producto de su actividad enzimática. Se estima que la cantidad de quinurenina cuantificada corresponde a una medida directa de la actividad de IDO. Para ello, desarrollamos un método basado en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que permitió medir quinurenina directamente en sobrenadantes de medio de cultivo. En primer lugar, se procedió a la construcción de una curva estándar de quinurenina a concentraciones conocidas (Figura 10), para luego interpolar el área de los picos cromatográficos (lecturas de absorbancia) obtenidos en nuestras muestras. Con el fin de probar el método desarrollado, se midió quinurenina en sobrenadantes de cultivos de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), las cuales de acuerdo a lo informado en la literatura, son productoras de IDO frente al estímulo con concanavalina A (ConA) por 48 horas. Como se observa en la Figura 11, las PBMCs estimulados con ConA produjeron los niveles de IDO reportados en la literatura, por lo que se les utilizó como control positivo del ensayo.

Para la evaluación de quinurenina en DCs, se utilizó una preparación de DCs enriquecidas (sobre el 89% de pureza) las cuales se purificaron mediante selección positiva con esferas magnéticas cubiertas con un anticuerpo monoclonal contra CD11c. Luego estas DCs fueron sometidas a estímulos con LPS por 4 y 24 horas, y posteriormente se les cambió el medio y fueron recultivadas por 24 horas adicionales, en ausencia de GM-CSF. Los sobrenadantes así obtenidos, fueron filtrados e inyectados directamente en el cromatógrafo, con el fin de cuantificar la concentración de quinurenina. Como se observa en la Figura 6, los niveles de quinurenina producidos por las DCs fueron muy bajos (inferiores a 1 μM) comparados a los de PBMCs ya sea estimulados o no con ConA. No se detectó ninguna diferencia en la producción de quinurenina entre las distintas preparaciones de DCs, independiente de la duración del estímulo con LPS a que fueron sometidas, o si éste estuvo ausente. Cabe señalar que la presencia de quinurenina en el medio de cultivo, determina siIDO se encuentra en estado activo y es capaz de generar dicho metabolito en cantidades suficientes como para iniciar el mecanismo tolerogénico, descrito para esta enzima, el cual parecería estar ausente en las 4hLPS/DCs.

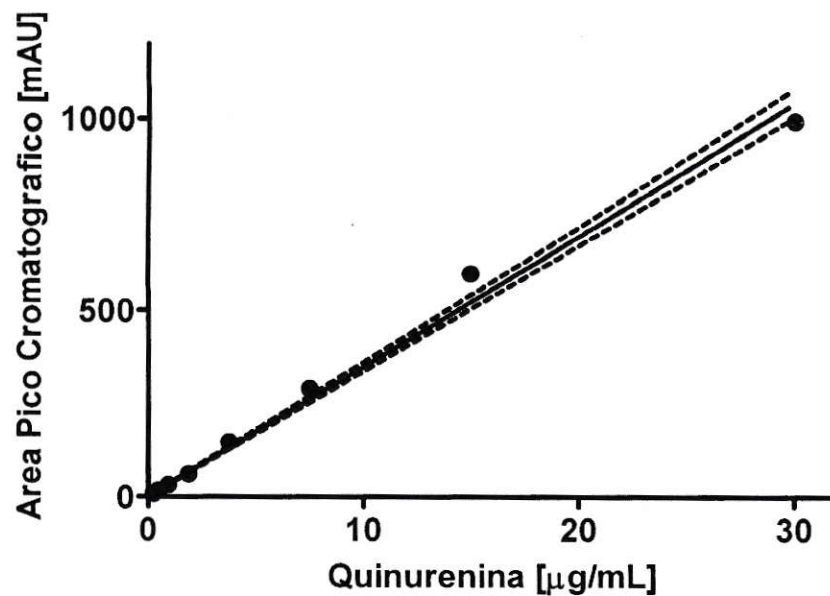


Figura 10: Curva estándar de quinurenina obtenida a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se hicieron estándares de quinurenina en metanol/agua (10:90 v/v) entre concentraciones de 0,1171875 µg/mL a 30µg/mL, mediante dilución seriada. La curva estándar arrojó una ecuación de la forma $y = 14,486x$, con un valor de $r^2 = 0,9896$ y un intervalo de confianza del 95%. Para obtener una interpretación más directa, las concentraciones se llevaron a µM.

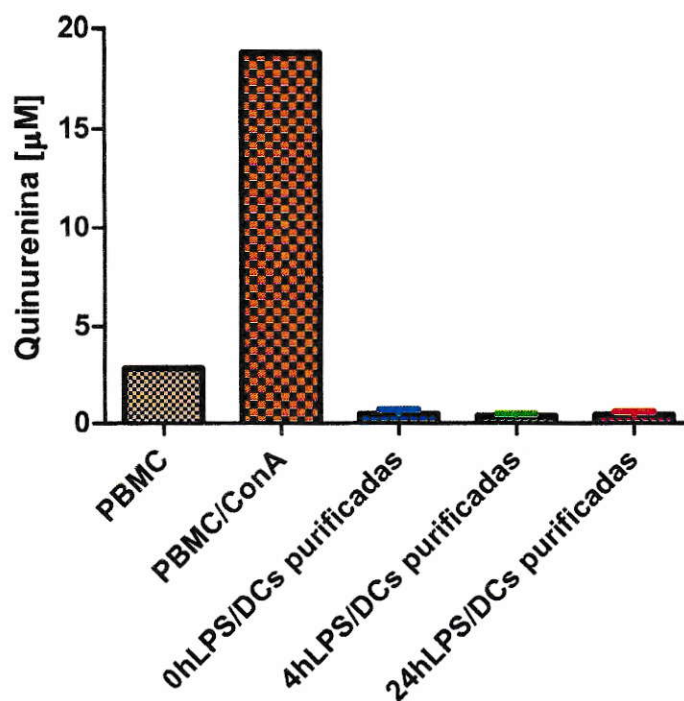


Figura 11: Producción de quinurenina, el producto de la reacción catalizada por la enzima indoleamina 2,3- dioxigenasa (IDO) en células dendríticas (DCs) murinas estimuladas diferencialmente con lipopolisacárido (LPS). Se midió la actividad funcional de la enzima IDO por la habilidad de las células de metabolizar triptófano del medio de cultivo a quinurenina. La quinurenina presente en el sobrenadante de cultivos de PBMC sin estimular y estimulado con Conavalina A (ConA) (control positivo de la técnica) fue cuantificada por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Para la medición de quinurenina en sobrenadantes de cultivos de DCs, éstas fueron purificadas mediante esferas magnéticas acopladas con un anticuerpo monoclonal anti-CD11c y luego sometidas a los distintos estímulos con LPS, e incubadas por 24 horas adicionales en medio. Las distintas preparaciones de DCs mostraron secretar concentraciones muy bajas de quinurenina, cuando se les comparó con el control positivo. El estímulo diferencial con LPS no afectó el nivel de producción de quinurenina por parte de las DCs.

DISCUSIÓN

Obtención de células dendríticas

En primer término, los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que el fenotipo de las DCs obtenidas a partir de precursores de medula ósea, utilizando condiciones experimentales equivalentes, no difieren de los descritos por Salazar y col. 2008. Así, los distintos estímulos con LPS no afectaron significativamente la expresión del marcador CD11c, ni tampoco cambiaron mayormente el porcentaje de células que lo expresan (Salazar y col. 2008). Debido a lo anterior, en este trabajo se consideró a todas las formas de DCs (0hLPS/DCs; 4hLPS/DCs y 24hLPS/DCs), expresando similares magnitudes el marcador CD11c, con un rendimiento de aproximadamente el 30% de DCs, considerando el total de células.

Determinación de la expresión deIDO

En este trabajo se determinó que las DCs estimuladas por cuatro horas con LPS (4hLPS/DCs), estarían sobreexpresando el gen *Indo*, mientras que el gen se encuentra reprimido a las 24 horas de estimulación con LPS (24hLPS/DCs), al comparar las expresiones con respecto a las células no estimuladas (0hLPS/DCs). Este resultado indicaría que la inmunosupresión observada *in-vivo*, al inyectar ratones con 4hLPS/CII/DCs, podría deberse a la mayor producción de proteína IDO y su actividad

podiera conferir la habilidad inmunosupresora expresada en la inhibición de CIA. A su vez la menor expresión del gen *Indo* en las 24hLPS/DCs, podría confirmar el fenotipo inmunogénico bastante caracterizado de estas DCs maduras (Salazar y col. 2008; Lutz & Schuler 2002; Steinman y col. 2003).

Sin embargo, existen diferencias en los resultados en la literatura actual, ya que en trabajos anteriores se ha estimulado a BM-DC con LPS por 24 horas, demostrándose que aumenta la expresión del gen *Indo*, comparado con las BMDC sin estimular (Jung y col. 2007). No obstante, este grupo no vio la expresión del gen a tiempos intermedios de estimulación con LPS, por lo que no es posible establecer si estas células estarían expresando mayormente este gen, si fueran estimuladas por tiempos cortos con LPS. También es importante notar, que sus observaciones se pudieran deber a la diferencia en concentración a la cual se añade el LPS, ya que aunque ambos LPS son provenientes de *E. coli*, en ese trabajo se utilizó a la concentración de 200ng/mL, mientras que en esta tesis se usó a 1µg/mL, una concentración 5 veces mayor.

Otro trabajo donde se analizó la expresión de IDO y el resto de los genes de la vía de las quinureninas, mediante microarrays y PCR en tiempo real, demostró que las DCs humanas sobreexpresan el gen IDO y el resto de las enzimas de la vía, al ser estimuladas con TNF- α y poly I:C (Mellroy y col. 2005). Es más, al analizar el efecto de diferentes tiempos de estimulación sobre la expresión de las enzimas de la vía, vieron que la mayor expresión de mRNA específico de IDO ocurrió a las 12 horas de estimulación, para luego decaer. Esta observación se hizo extensiva a todas las enzimas de la vía, aunque nunca más bajo que el nivel sin estímulo (Mellroy y col. 2005). Aunque en este estudio se trabajó con DCs humanas y el estímulo fue una combinación de TNF- α y TLR-3 poly

I:C, es uno de los pocos trabajos donde se estudió la expresión del gen *Indo* en el tiempo bajo la estimulación con un ligando de TLR.

Otro trabajo, usando BM-DCs, estimuladas con LPS por diferentes tiempos, demostró que la sobreexpresión del gen *Indo* a las 4 y 6 horas de estimulación, con el pick de expresión a las 6 horas de estimulación. A las 7 y 24 horas la expresión mostró ser tan baja como en células no estimuladas (Jaen y col. 2008). En este trabajo se utilizó LPS a la misma concentración (1µg/mL) y origen (*E. coli*) que en esta tesis, y aunque no vimos la expresión de IDO a las 6 horas de estimulación con LPS, si observamos una sobreexpresión solo a las 4 horas de estimulación y una caída de ésta a las 24 horas del estímulo, lo cual es plenamente consistente con lo reportado en este trabajo (Jaen y col. 2008).

Determinación de la concentración de proteína IDO por Western Blot

En este trabajo se analizó la concentración de la proteína IDO en las DCs sometidas a estímulos diferenciales. Aquí se intentó relacionar la expresión a nivel de mRNA con la cantidad de proteína. Pudimos establecer que la concentración de la proteína IDO, no cambia significativamente para los distintos tiempos de estimulación con LPS. Aunque se observó la tendencia de un aumento a las 4 horas de estimulación, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. En relación a la sobre-expresión de la proteína IDO, la literatura muestra que ésta aumenta en BM-DCs, luego del estímulo con LPS por 24 horas (Jung y col. 2007). Sin embargo, en este estudio no se evaluó la expresión de la proteína a tiempos intermedios de estimulación, ni tampoco su actividad. Como se dijo

previamente, se trabajó con una concentración de LPS de 200ng/mL, inferior a los 1µg/mL trabajados en esta tesis.

Determinación de la concentración de quinurenina por HPLC

En este trabajo se determinó que las BM-DC generadas, no producen cantidades suficientes de quinurenina para considerar que estas células generen la inmunosupresión por el mecanismo deIDO descrito para DCs CD8⁺. Sólo fue posible detectar quinurenina al cultivar por 24 horas DCs purificadas, donde no se detectó diferencias significativas en la producción de quinurenina entre las 0hLPS/DCs, 4hLPS/DCs y 24hLPS/DCs.

El método de cuantificación de quinurenina fue elaborado por nuestro laboratorio, en colaboración con el Laboratorio de Toxinas Marinas de la Universidad de Chile, siguiendo el protocolo de (Yong & Lau 1979) con modificaciones. Fue necesario probar el método con muestras caracterizadas en la literatura, así como control vimos la producción de quinurenina de PBMC humanas, sin estimular y estimuladas con ConA por 48 horas. Ambos resultados concuerdan con lo reportado en literatura, dando 2,8µM para PBMC sin estímulo y 18,8µM al estimularlas con ConA (Winkler y col. 2007; Schroecksnadel y col. 2005).

Los resultados obtenidos en esta tesis para BM-DCs diferencialmente estimuladas con LPS, indicaron niveles muy bajos de quinurenina (1,0 uM), los que además fueron similares entre las distintas preparaciones de DCs. En un trabajo reciente sobre la secreción de quinurenina y mecanismo IDO en BM-DC, se demostró que estas células

sin estimular, secretan cantidades muy pequeñas de quinurenina (0,3 μM), mientras que al estimularlas con CpG, ligando de TLR-9, se observa un pequeño aumento no significativo a 0,5 μM (Hara y col. 2008a). Los autores postulan que estas células no sólo no son secretoras, sino que consumen quinurenina como método de inhibir la inmunosupresión de células secretoras de quinurenina, tales como las CD8^+ (Hara y col. 2008a). Sin embargo, posteriormente, una publicación de este mismo grupo señala que el método empleado para la medición de quinurenina por HPLC, subestima la secreción de quinurenina al medio (Hara y col. 2008b). Lo anterior se debería a la producción de nitrito NO_2^- por parte de estas células, el cual se induciría posterior al estímulo. Éste compuesto actuaría como interferente de la medición de quinurenina, indicando una producción basal post estímulo de 0,2-0,3 μM . Aun cuando en nuestro protocolo de HPLC tomamos medidas para no subestimar la concentración de quinurenina, los resultados descritos por (Hara y col. 2008a) muestran concordancia con lo obtenido en esta tesis, con un promedio de 0,49 μM para las 0hLPS/DCs, concentración que no mostró diferencias significativas con células estimuladas por 4 o 24 horas con LPS.

No obstante lo anterior, la literatura indica que aun existe contradicción sobre si todas las DCs son capaces de iniciar el mecanismo tolerogénico de IDO (Grohmann y col. 2003b; Mellor & Munn 2004). Aunque la mayoría de los resultados apunta a que solo una subpoblación de DCs utilizaría este mecanismo (Mellor y Munn 2004), en estudios previos se asumía expresión de IDO y su actividad sólo era estimada analizando su expresión a nivel de mRNA (Jaen y col. 2008), no midiéndose quinurenina del medio de estas células, siendo claramente necesario para inferir acerca de su actividad. Nuestros

resultados indican que aunque el gen *Indo* se sobreexpresa bajo diversos estímulos proinflamatorios, como lo es la estimulación con LPS, la actividad de la enzima, o secreción de quinurenina se mantiene a niveles muy inferiores, incapaces de iniciar el mecanismo tolerogénico de IDO.

CONCLUSIONES

Al analizar el patrón de expresión del gen *Indo*, codificante de IDO, en DCs tratadas por distintos tiempos de estimulación con LPS, se determinó que estas células muestran diferencias significativas en la expresión de este gen. Así, las DCs estimuladas por 4 horas con LPS presentaron una sobreexpresión de *Indo*, comparadas con DCs sin estimular, o estimuladas por periodos de 24 horas con LPS.

La cantidad de proteína IDO en DCs no se ve afectada por los estímulos con LPS, presentando cantidades similares de proteína para las células no estimuladas o estimuladas por 4 o 24 horas con LPS. Ello, a pesar que existe una sobreexpresión del gen *Indo* a las 4 horas, lo que podría indicar que hay una regulación post transcripcional para la regulación de esta proteína.

La actividad de la enzima IDO, medida por su capacidad de degradar triptófano a quinurenina, se encuentra muy reprimida en estas células, siendo capaces de producir concentraciones muy pequeñas de quinurenina, probablemente insuficientes para tener algún rol inmunosupresor. Es más, la actividad de la enzima no se ve afectada por los diversos tiempos de estimulación con LPS, ya que las células no estimuladas y las estimuladas por 4 o 24 horas con LPS, secretan concentraciones similares de quinurenina al medio. Se vio que estas células poseen cantidades considerables de la enzima IDO, lo que podría indicar que su inactividad se deba a una regulación de esta actividad y no a la ausencia de la proteína.

De acuerdo a la hipótesis planteada se probó en esta tesis que el rol inmunorregulador que ejercen las DCs estimuladas por 4 horas con LPS no se debe al mecanismo IDO. Esto debido a que las células no presentan ni un aumento en la proteína IDO, ni de su actividad. Es más, estas células expresan cantidades de quinurenina muy menores que las reportadas para células que generan inmunosupresión por este mecanismo. Sobre si estas células activarían este mecanismo *in-vivo* bajo estímulos encontrados en el huésped, es improbable, ya que se determinó que todas las DCs analizadas, incluso las estimuladas por 24 horas con LPS, tienen la misma cantidad de proteína IDO. Haciendo la activación *in-vivo* de IDO en las células estimuladas por 4 horas con LPS irrelevante.

REFERENCIAS

1. Babcock, T., Carlin, J. 2000. Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in interferon-treated epithelial cells. *Cytokine* 12:588-94.
2. Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Yong-Jun Liu, Y., Pulendran, B., and Palucka, K. 2000. Immunobiology of Dendritic Cells 18: 767-811.
3. Belladonna, M., Grohmann, U., Guidetti, P., Volpi, C., Bianchi, R., Fioretti, M., Schwarcz, R., Fallarino, F., Puccetti, P. 2006. Kynurenine pathway enzymes in dendritic cells initiate tolerogenesis in the absence of functional IDO. *The Journal of Immunology* 177: 130-137.
4. Fallarino, F., Vacca, C., Orabona, C., Belladonna, M., Bianchi, R., Marshall, B., Keskin, D., Mellor, A., Fioretti, M., Grohmann, U., Puccetti, P. 2002. Functional expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by murine CD8 α ⁺ dendritic cells. *International Immunology* 14: 65-68.
5. Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, k., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M., Fioretti, M., Alegre, M., Puccetti, P. 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nature Immunology* 4: 1206 – 1212.
6. Fallarino, F., Puccetti, P. 2006. Toll-like receptor 9-mediated induction of the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism. *European Journal of Immunology* 36: 8-11.
7. Fujigaki, H., Saito, K., Fujigaki, S., Takemura, M., Sudo, K., Ishiguro, H., Seishima, M. 2006. The Signal Transducer and Activator of Transcription 1 α and Interferon Regulatory Factor 1 Are Not Essential for the Induction of Indoleamine 2,3-Dioxygenase by Lipopolysaccharide: Involvement of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Nuclear Factor- κ B Pathways, and Synergistic Effect of Several Proinflammatory Cytokines. *Journal of Biochemistry* 139: 655-662.
8. Grohmann, U., Bianchi, R., Belladonna, M., Silla, S., Fallarino, F., Fioretti, M., and Puccetti, P. 2000. IFN- γ Inhibits Presentation of a Tumor/Self Peptide by CD8 α ⁺ Dendritic Cells Via Potentiation of the CD8 α ⁺ Subset. *The Journal of Immunology*. 165: 1357-1363.
9. Grohmann, U., Fallarino, F., Silla, S., Bianchi, R., Belladonna, M., Vacca, C., Micheletti, A., Fioretti, M., and Puccetti, P. 2001a. CD40 Ligation Ablates the Tolerogenic Potential of Lymphoid Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*. 166: 277-283.
10. Grohmann, U., Fallarino, F., Bianchi, R., Belladonna, M., Vacca, C., Orabona, C., Uyttenhove, C., Fioretti, M., and Puccetti, P. 2001b. IL-6 Inhibits the Tolerogenic

Function of CD8 α ⁺ Dendritic Cells Expressing Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *The Journal of Immunology*. 167: 708-714.

11. Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M., Bianchi, R., Fioretti, M., and Puccetti, P. 2002. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nature Immunology* 3: 1097 – 1101.
12. Grohmann, U., Bianchi, R., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Micheletti, A., Fioretti, M., Puccetti, P. 2003a. Functional Plasticity of Dendritic Cell Subsets as Mediated by CD40 Versus B7 Activation. *The Journal of Immunology* 171: 2581-2587.
13. Grohmann, U., Fallarino, F., and Puccetti, P. 2003b. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends in Immunology*. 24: 242-248.
14. Grohmann, U., Volpi, C., Fallarino, F., Bozza, S., Bianchi, R., Vacca, C., Orabona, C., Belladonna, M., Ayroldi, E., Nocentini, G., Boon, L., Bistoni, F., Fioretti, M., Romani, L., Riccardi, C., Puccetti, P. 2007. Reverse signaling through GITR ligand enables dexamethasone to activate IDO in allergy. *Nature Medicine* 13: 579 – 586.
15. Hara, T., Yamakura, F., Takikawa, O., Hiramatsu, R., Kawabe, T., Isobe, K., Nagase, F. 2008a. High-affinity uptake of kynurenine and nitric oxide-mediated inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in bone marrow-derived myeloid dendritic cells. *Immunology Letters*. 116: 95-102.
16. Hara, T., Ogasawara, N., Akimoto, H., Takikawa, O., Hiramatsu, R., Kawabe, T., Isobe, K., Nagase, F. 2008b. Diazotization of kynurenine by acidified nitrite secreted from indoleamine 2,3 dioxygenase-expressing myeloid dendritic cells. *Journal of immunological methods*. 332: 162-169.
17. Hayden, M., Ghosh, S. 2004. Signaling to NF-kappaB. *Genes and Development* 18:2195-224.
18. Heyes, M., Chen, C., Major, E., Saito, K. 1997. Different kynurenine pathway enzymes limit quinolinic acid formation by various human cell types. *Biochememical Journal* 326: 351–356.
19. Hwu, P., Du, M., Lapointe, R., Do, M., Taylor, M., and Young, H. 2000. Indoleamine 2,3-Dioxygenase Production by Human Dendritic Cells Results in the Inhibition of T Cell Proliferation. *The Journal of Immunology* 164: 3596-3599.
20. Jaen, O., Rullé, S., Bessis, N., Zago, A., Boissier, MC., Falgarone, G. 2008. Dendritic cells modulated by innate immunity improve collagen-induced arthritis and induce regulatory T cells in vivo. *Immunology* 126: 35 – 44.
21. Jung, I., Lee, C., Jeong, Y., Lee, J., Park, W., Han, J., Park, Y. 2007. Differential regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide and interferon gamma in murine bone marrow derived dendritic cells. *FEBS Letters*. 581:1449-1456.

22. Lutz, M., Schuler, G. 2002. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity. *Trends in Immunology* 23: 445- 449.
23. McIlroy, D., Tanguy-Royer, S., Le Meur, N., Guisle, I., Royer, P., Léger, J., Meflah, K., and Marc Grégoire, M. 2005. Profiling dendritic cell maturation with dedicated microarrays. *Journal of Leukocyte Biology* 78: 794-803.
24. Mellor, A., Keskin, D., Johnson, T., Chandler, P., Munn, D. 2002. Cells Expressing Indoleamine 2,3-Dioxygenase Inhibit T cell Responses. *The journal of Immunology* 168: 3771-3776.
25. Mellor, A., y Munn, D. 2003. Tryptophan Catabolism and regulation of Adaptive Immunity. *The journal of Immunology* 170: 5809-5813.
26. Mellor, A., y Munn, D. 2004.IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nature Reviews Immunology* 4: 762-774.
27. Mellor, A., Chandler, P., Baban, B., Hansen, A., Marshall, B., Pihkala, J., Waldmann, H., Cobbold, S., Adams, E., Munn, D. 2004. Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent T cell regulatory functions following CTLA4-mediated induction of indoleamine 2,3 dioxygenase. *International Immunology* 16: 1391-1401.
28. Mellor, A. 2005. Indoleamine 2,3 dioxygenase and regulation of T cell immunity. *Biochemical and Biophysical research communications* 338: 20-24.
29. Mellor, A., y Munn, D. 2008. Creating immune privilege: active local suppression that benefits friend, but protects foes. *Nature Reviews Immunology* 8: 74-80
30. Morelli, A., Thomson, A. 2007. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nature Reviews Immunology* 7: 610-621.
31. Moser, M. 2003. Dendritic Cells in Immunity and Tolerance—Do They Display Opposite Functions?. *Immunity* 19: 5-8.
32. Munn, D., Sharma, M., Mellor, A. 2004. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4⁺ T Cells Triggers Indoleamine 2,3-Dioxygenase Activity in Dendritic Cells. *The journal of Immunology* 172: 4100-4110.
33. Orabona, C., Puccetti, P., Vacca, C., Bicciano, S., Luchini, A., Fallarino, F., Bianchi, R., Velardi, E., Perruccio, K., Velardi, A., Bronte, V., Fioretti, M., and Grohmann, U. 2006. Toward the identification of a tolerogenic signature in IDO-competent dendritic cells. *Blood* 107: 2846-2854.
34. Puccetti, P. 2007. On watching the watchers: IDO and type I/II IFN. *European Journal of Immunology* 37: 876-879.
35. Puccetti, P., Grohmann, U. 2007. IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF- κ B activation. *Nature Reviews Immunology*. 7:817-823.

36. Robinson, M., Shirey, K., Carlin, J. 2003; Synergistic Transcriptional Activation of Indoleamine Dioxygenase by IFN- γ and Tumor Necrosis Factor- α . *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 23: 413-421.
37. Salazar, L., Aravena, O., Abello, P., A Escobar A., Contreras-Levicoy, J., Rojas-Colonelli, N., Catalán, D., Aguirre, A., Zúñiga, R., Pesce, B., González, C., Cepeda, R., Cuchacovich, M., Molina, M., Salazar-Onfray, F., Delgado, M., Toes, R., Aguillón, J. 2008. Modulation of established murine collagen-induced arthritis by a single inoculation of short-term lipopolysaccharide-stimulated dendritic cells *Annals of the Rheumatic Diseases* 67:1235-1241.
38. Salazar, L., Aravena, O., Contreras-Levicoy, J., Pesce, B., Catalan, D., Zuniga, R., Iruretagoyena, M., Kalergis, A., Aguillón, J.C. 2007. Short-term lipopolysaccharide stimulation induces differentiation of murine bone marrow-derived dendritic cells into a tolerogenic phenotype. *European Cytokine Network* 18: 78-85.
39. Schroecksnadel, K., Winkler, C., Wirleitner, B., Schennach, H., Fuchs, D. 2005. Aspirin down-regulates tryptophan degradation in stimulated human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Clinical & Experimental Immunology* 140: 41 – 45.
40. Steinman, R., Hawiger, D., Nussenzweig, M. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annual Review of Immunology* 21: 685-711.
41. Tas, S., Vervoordeldonk, M., Hajji, N., Schuitemaker, J., Sluijs, K., May, M., Ghosh, S., Kapsenberg, M., Tak, P., and Jong, E. 2007. Noncanonical NF- κ B signaling in dendritic cells is required for indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) induction and immune regulation. *Blood*. 110: 1540-1549.
42. Terness, P., Chuang, J., and Opelza, G. 2006. The immunoregulatory role of IDO-producing human dendritic cells revisited. *Trends in Immunology* 27: 68-73.
43. Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., Shortman, K. 2000. CD4 and CD8 Expression by Dendritic Cell Subtypes in Mouse Thymus and Spleen. *The Journal of Immunology* 164: 2978-2986.
44. Weigel, B., Nath, N., Taylor, P., Panoskaltsis-Mortari, A., Chen, W., Krieg, A., Brasel, K., Blazar, B. 2002. Comparative analysis of murine marrow-derived dendritic cells generated by Flt3L or GM-CSF/IL-4 and matured with immune stimulatory agents on the in vivo induction of antileukemia responses. *Blood* 100: 4169-417.
45. Winkler, C., Schroecksnadel, K., Schennach, H., Fuchs, D. 2007. Vitamin C and E Suppress Mitogen-Stimulated Peripheral Blood Mononuclear Cells in vitro. *International Archives of Allergy and Immunology* 142:127-132.
46. Yong, S. y Lau, S. 1979. Rapid separation of Tryptophan, kynurenines, and indoles using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 175: 343-346.

47. Yu, G., Fang, M., Gong, M. Liu, L., Zhong, J., Feng, W., Xiong, P., Wang, C., Gong, F. 2008. Steady state dendritic cells with forced IDO expression induce skin allograft tolerance by upregulation of regulatory T cells. *Transplant Immunology* 18: 208-219.