

UCH-FC
Biotecnología
M963
C.1

i



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

TRANSDUCCIÓN DE LAS CÉLULAS A549 Y MSC *IN VITRO* Y DE HEPATOCITOS MURINOS *IN VIVO* CON UN VECTOR ADENOVIRAL QUE CONTIENE EL GEN IDO.

Seminario de Título

Entregado a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

PATRICIO ERNESTO MUÑOZ TAPIA

Mayo, 2007
Santiago - Chile



Director de Seminario de Título: Dra Paulette Conget

ESCUELA DE PREGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



TRANSDUCCIÓN DE LAS CÉLULAS A549 Y MSC *IN VITRO* Y DE HEPATOCITOS MURINOS *IN VIVO* CON UN VECTOR ADENOVIRAL QUE CONTIENE EL GEN IDO.

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

PATRICIO ERNESTO MUÑOZ TAPIA

Dra. Paulette Conget
Directora de Seminario de Título:

Comisión de Evaluación de la Seminario de Título

Dra. María Rosa Bono
Presidente Comisión

Dr. Marco Tulio Nuñez
Evaluador



Santiago de Chile, ----- Mayo de 2007

f



A mi padre

AGRADECIMIENTOS

A Viviana Verónica por haberme elegido ser parte de su vida, y espero estar algún día la altura de su generosidad.

A mi hermano, compañero de juegos y de vida.

A la Dra. Paulette Conget, quien diseñó el trabajo aquí presentado.

A la Profesora Susana Nieto por darme todas las posibilidades y el aliento para terminar.

Al Prof. Alfonso Valenzuela y todos los académicos que me ayudaron a terminar este trabajo, muchas gracias por el tiempo y la disposición para enseñarme.



INDICE



PAGINA

ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xi
SUMMARY	xiii
INTRODUCCIÓN	1
Utilización de vectores adenovirales en terapia génica	1
Respuesta inmune provocada por los vectores adenovirales	5
La enzimaIDO y su relación con la tolerancia inmunológica	8
MÉTODOS	12
1. Cultivos Celulares	12
1.1 Células y Medios	12
1.2 Tripsinización y Subcultivo	13
2. Vectores Adenovirales	14
2.1 Construcción de vectores adenovirales	14
2.2 Propagación de vectores adenovirales	16
2.3 Purificación de vectores adenovirales	16
2.4 Diálisis de vectores adenovirales	17
2.5 Almacenamiento de vectores adenovirales	17
2.6 Cuantificación de vectores adenovirales	17
3. Transferencia génica mediada por vectores adenovirales <i>in vitro</i>	19

3.1 Transducción de células adherentes con vectores adenovirales	19
3.2 Evaluación de la eficiencia de transducción de vectores adenovirales en función de la expresión del transgen reportero GFP	19
3.3 Análisis expresión transgen IDO	20
3.3.1 RT-PCR para IDO	20
3.3.1.1 Aislamiento de RNA	20
3.3.1.2 Cuantificación de RNA	21
3.3.1.3 Transcripción reversa	21
3.3.1.4 PCR	21
3.3.1.5 Análisis electroforético	22
3.3.2 Actividad enzimática de IDO	24
4. Transferencia génica mediada por vectores adenovirales <i>in vivo</i>	25
4.1 Animales	25
4.2 Administración vectores adenovirales	25
4.3 Obtención de cortes histológicos	25
4.4 Evaluación transducción de vectores adenovirales en función de la expresión del transgen reportero GFP	26
RESULTADOS	
Evaluación <i>in vitro</i> de la eficiencia de transducción de los vectores adenovirales AdGFP y AdIDO en células A549 y MSC	27
Determinación de la expresión del transgen IDO movilizado en el vector adenoviral AdIDO en células A549	29
Determinación <i>in vitro</i> de actividad de la enzima IDO, a través de su función catalítica	31
Efecto de la expresión del gen IDO sobre la proliferación de las células A549 y MSC transducidas con los vectores AdGFP y AdIDO	33
Transducción hepática mediada por los vectores adenovirales AdGFP y AdIDO	35



Infiltración celular en tejido hepático de animales inyectados con los vectores adenovirales AdGFP y AdPIDO	37
DISCUSIÓN	39
Expresión de transgenes de vectores adenovirales <i>in vitro</i>	40
Expresión del transgen GFP de vectores adenovirales <i>in vivo</i>	42
Proyecciones	43
CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFIA	46



ÍNDICE DE TABLAS

N° TABLA	TITULO	PAGINA
1	Partidores utilizados en amplificación de genes GADPH e IDO.	23



ÍNDICE DE FIGURAS

Nº FIGURA	TITULO	PAGINA
1	Estructura de un adenovirus.	2
2	Mecanismo de entrada adenovirus a las células.	4
3	Respuesta inmune celular y humoral contra vectores adenovirales.	6
4	Vector adenoviral AdIDO linealizado.	15
5	Transducción de células A549 y MSC mediada por vectores adenovirales AdGFP y AdIDO.	28
6	Expresión del gen IDO en células A549 transducidas con el vector AdIDO.	30
7	Cinética de catálisis de triptófano en las células transducidas con los vectores AdGFP y AdIDO.	32
8	Efecto de la expresión del gen IDO sobre la proliferación de las células A549 y MSC.	34
9	Expresión del transgen reportero (GFP) en cortes histológicos de hígados de animales transducidos con los vectores AdGFP y AdIDO.	36
10	Infiltración celular en hígados de animales transducidos con los vectores AdGFP y AdIDO.	38



LISTA DE ABREVIATURAS
(Según orden alfabético)

A549	Células de carcinoma pulmonar humano
Ad5	Adenovirus humano serotipo 5
CAR	Receptor coxsackie/adenovirus
CPA	Célula presentadora de antígeno
DE	Desviación estándar
GADPH	Enzima gliceraldehido fosfodeshidrogenasa
GFP	Proteína Fluorescente Verde
IDO	Enzima indolamina 2,3 dioxigenasa
INF-γ	Citoquina interferon gamma
MHC-I, MHC-II	Moléculas de Histocompatibilidad de clase I y II
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero.
MSC	Células Troncales Mesenquimáticas
MOI	Multiplicidad de infección
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PBS	Solución fosfato salino
pfu	Partículas formadoras de placas
SFB	Suero fetal bovino
TCR	Receptor Linfocito T
Tm	Temperatura de desnaturación

RESUMEN

Uno de los mayores problemas del uso de vectores adenovirales en terapia génica es la respuesta inmunológica que desarrolla el receptor contra el vector de transferencia génica y/o el producto de los transgenes movilizados por éste. Para prevenir o disminuir este efecto, se propone inducir tolerancia inmune selectiva en las células modificadas genéticamente. Para ello, se diseñó y construyó un vector adenoviral de primera generación que contiene la región codificante de la enzima indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO). La expresión de esta enzima en la interfase materno-fetal es necesaria para garantizar la tolerancia del feto por la madre y sería un componente importante para mantener la tolerancia periférica a los antígenos propios.

La enzima IDO cataliza el paso limitante en el catabolismo de triptófano, señal que determina la transición entre las fases del ciclo celular G1 a S de los linfocitos T activados. La ausencia de triptófano o la presencia de metabolitos originados de su degradación promueven apoptosis de los linfocitos T activados, resultando en la delección de los clones de linfocitos T reactivos contra los antígenos que los activaron.

Mediante el método de Volgestein (recombinación homologa), se construyeron los vectores AdGFP y AdIDO. Ambos vectores contienen el gen reportero que codifica para la proteína fluorescente verde (GFP) bajo el control del promotor constitutivo de citomegalovirus (CMV) y el terminador del gen β - actina. Además, AdIDO contiene el cDNA de IDO, bajo el control del promotor CMV y el terminador del gen β - actina.

Se evaluó *in vitro* la capacidad de los vectores adenovirales de transducir células humanas derivadas de carcinoma pulmonar (A549) y células troncales mesenquimáticas (MSC). Se constató que por microscopía de epifluorescencia las

células expuestas a los distintos vectores expresaron GFP. En las células transducidas con el vector adenoviral AdIDO fue posible detectar a través de RT-PCR el mRNA de IDO. Adicionalmente la actividad catalítica de esta enzima fue determinada por la disminución de la concentración de triptófano en los medios de cultivo.

La expresión de la enzima IDO provocó la inhibición de la proliferación celular en las células A549, pero no en las células MSC.

La evaluación de los vectores adenovirales *in vivo* se realizó en ratones inmunocompetentes Balb/c inyectados por vía intravenosa y sacrificados a los 7, 14 y 21 días post-inyección. Se mostró que los vectores transducían células hepáticas a través de la expresión de GFP, la cual tanto para el vector AdIDO como AdGFP, tuvo un máximo de expresión a los 14 días post-transducción y una mínima expresión a los 21 días post-transducción.

Al analizar cortes histológicos de hígado en estos animales se encontró que en ambos casos hubo presencia de grupos de células infiltrantes. Esto sugiere que ambos vectores promovieron una respuesta inmune del huésped.

Se concluye que el vector AdIDO es capaz de transducir tanto células humanas como murinas y de expresar el transgen IDO. Este vector puede ser utilizado para ensayos *in vitro* e *in vivo* de inhibición de células del sistema inmune.

SUMMARY

One of the mayor problems of the use of adenoviral vectors in gene therapy is the immune response that the host develops against the vector and/or the product of transgenes mobilized thereafter. In order to prevent or to diminish this effect we propose to induce selective immune tolerance in the genetically modified cells, For this purpose, we designed and constructed a first generation adenoviral vector that contains the encoding region of indolamine 2,3 dioxygenase (IDO).The expression of this enzyme in the fetal maternal interphase is necessary to ensure the tolerance of the fetus by the mother, and it is an important component to maintain the peripheric tolerance to the person's own-antigens.

The reaction catalized by the enzyme is the limiting step in tryptophan catabolism, which determines the transition between G1 to S phases of the cellular cycle of activated T lymphocytes. The absence of tryptophan, or the presence of metabolites originated from its degradation, promotes apoptosis in activated T lymphocytes resulting in the deletion of the clones of lymphocytes T that are reactive against the antigens that activated them.

The AdGFP and AdIDO vectors were constructed by the method of Volgestein, (homologue recombination). Both vectors contain the reporter gene encoding for the green fluorescent protein (GFP) under the control of the constituent promoter of citomegalovirus (CMV) and the terminator of the β - actin gene. AdIDO contains also cDNA for IDO, under the control of the CMV promoter and the terminator of the β - actin gene.

The ability of the adenoviral vectors to transduce human cells derived from pulmonary carcinoma (A549) and mesenchymal stem cells (MSC) was evaluated. The

cells exposed to the different vectors expressed GFP when analyzed by epifluorescence microscopy. In cells transduced with AdIDO, it was possible to detect the mRNA of IDO by RT-PCR, and the catalytic activity of this enzyme was determined by the decrease of tryptophan concentration in the culture medium.

The expression of the enzyme IDO caused the inhibition of the cellular proliferation of A549 cells, but not of MSC cells.

The evaluation of the adenoviral vectors *in vivo* was carried out in immunocompetent Balb/c mice injected by intravenous route and sacrificed at days 7, 14 and 21 post-injection. We verified that the adenoviral vectors transduced hepatic cells since there was GFP expression. Both vectors had a maximum of expression at day 14 post-transduction and a minimum expression at day 21 post-transduction.

When analyzing histological sections from the livers of these animals, we observed that with both adenoviral vectors there were groups of infiltrating cells, which suggests that both vectors elicited an immune response in the host.

In conclusion, the AdIDO vector is able to transduce human cells as well as murine cells, and also to express the IDO transgene. This vector can be used for *in vitro* and *in vivo* assays of immune system cell inhibition.

INTRODUCCIÓN

Utilización de vectores adenovirales en terapia génica

Se han descrito unas 4000 enfermedades hereditarias, entre ellas se encuentran un número importante de enfermedades monogénicas causadas por el defecto de un solo gen, cuyo tipo de herencia sigue las pautas mendelianas (fibrosis quística, acondroplasia, neurofibromatosis) (Blomberg, 2003). Este tipo de enfermedades son un ejemplo donde la terapia génica supone una vía esperanzadora de tratamiento.

La terapia génica consiste en introducir material genético (transgen) en células, el cual reemplaza, complementa, o bloquea la expresión de uno o más genes defectuosos. Esta terapia puede realizarse *ex vivo*, es decir, las células pueden ser modificadas fuera del paciente y luego transplantadas. También, puede realizarse *in vivo*, mediante la incorporación de los transgenes directamente al cuerpo del paciente.

Para lograr la transferencia génica se requiere de vehículos llamados vectores, en los cuales los transgenes son incorporados, lo que permite su entrada a la célula blanco. Tanto la unión del vector a la célula, como su internalización y la posterior expresión del transgen, son potenciales limitantes de la terapia génica (Wilson, 1996).

Entre los vectores de transferencia génica más ampliamente estudiados se encuentran los vectores adenovirales. Generalmente ellos corresponden a formas recombinantes del serotipo 2 o 5 del adenovirus humano. Estructuralmente no presentan cubierta externa (bicapa lipídica) pero sí una cubierta proteica o cápside, y constan de un genoma de DNA lineal de doble hebra de 36 kilobases (kb) (figura 1). Dicho genoma incluye los genes tempranos (E1-E4) que codifican para proteínas.

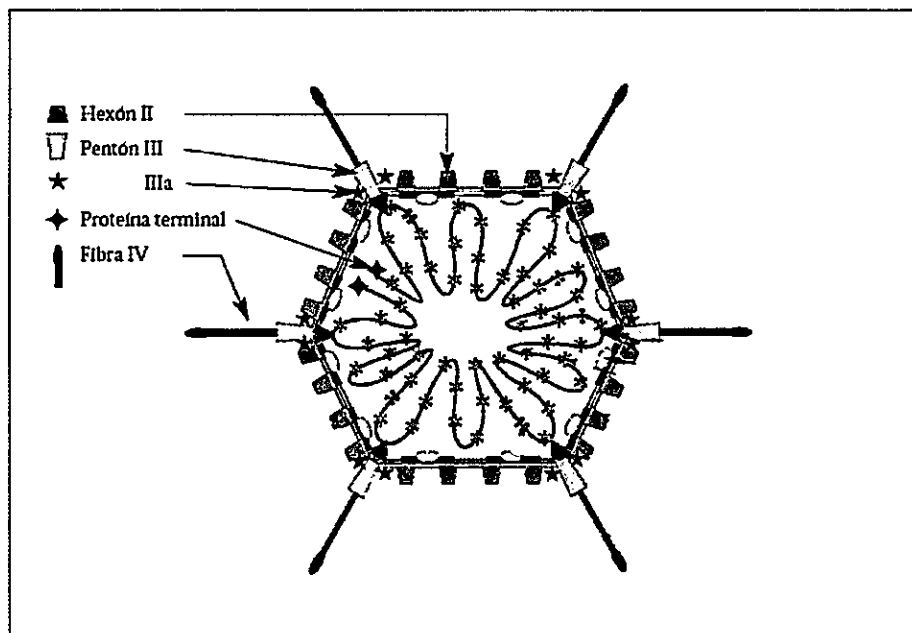


Figura 1: Estructura de un adenovirus

reguladoras de la replicación, y los genes tardíos (L1–L5) que codifican para proteínas estructurales del virus.

Para generar un vector adenoviral de primera generación, los genes tempranos E1 y E2 son eliminados para impedir su replicación y, en su lugar, se pueden insertar transgenes de hasta 7,5 kb. (Mastrangeli, 1993).

Los vectores adenovirales presentan tropismo por células epiteliales o hepáticas entre otras, que expresan tanto el receptor CAR (coxsackie/adenovirus receptor) como las glicoproteínas de superficie llamadas integrinas αv . La entrada del vector adenoviral a la célula blanco se inicia a través de una unión de alta afinidad entre la glicoproteína presente en la cápside del vector llamada fibra, y el receptor celular CAR. Luego, ocurre la interacción entre el pentón de la cápside (compuesto por varias proteínas) y las integrinas αv que se encuentran en la superficie de la célula. Esto último, permite la internalización del vector adenoviral a través de endocitosis (figura 2). Una vez dentro de la célula, el vector escapa del endosoma, debido a la capacidad endocitolítica del pentón, y entra al núcleo donde el DNA viral permanece como episoma. Tanto la transcripción, como la replicación y el empaquetamiento de la partícula viral ocurren en el núcleo de la célula infectada.

La utilización masiva de vectores adenovirales en protocolos de terapia génica, principalmente en animales, se debe a las ventajas que éstos presentan: a) se pueden producir en altas concentraciones; b) no requieren que la célula blanco esté proliferando para ingresar al núcleo y expresar su genoma; c) presentan altos niveles de expresión de transgenes, en una gran variedad de tipos celulares, d) el DNA viral permanece como episoma en el núcleo de la célula, por lo tanto, su potencial oncogénico es menor comparado con aquellos vectores virales que se integran al DNA celular (Wilson, 1996)

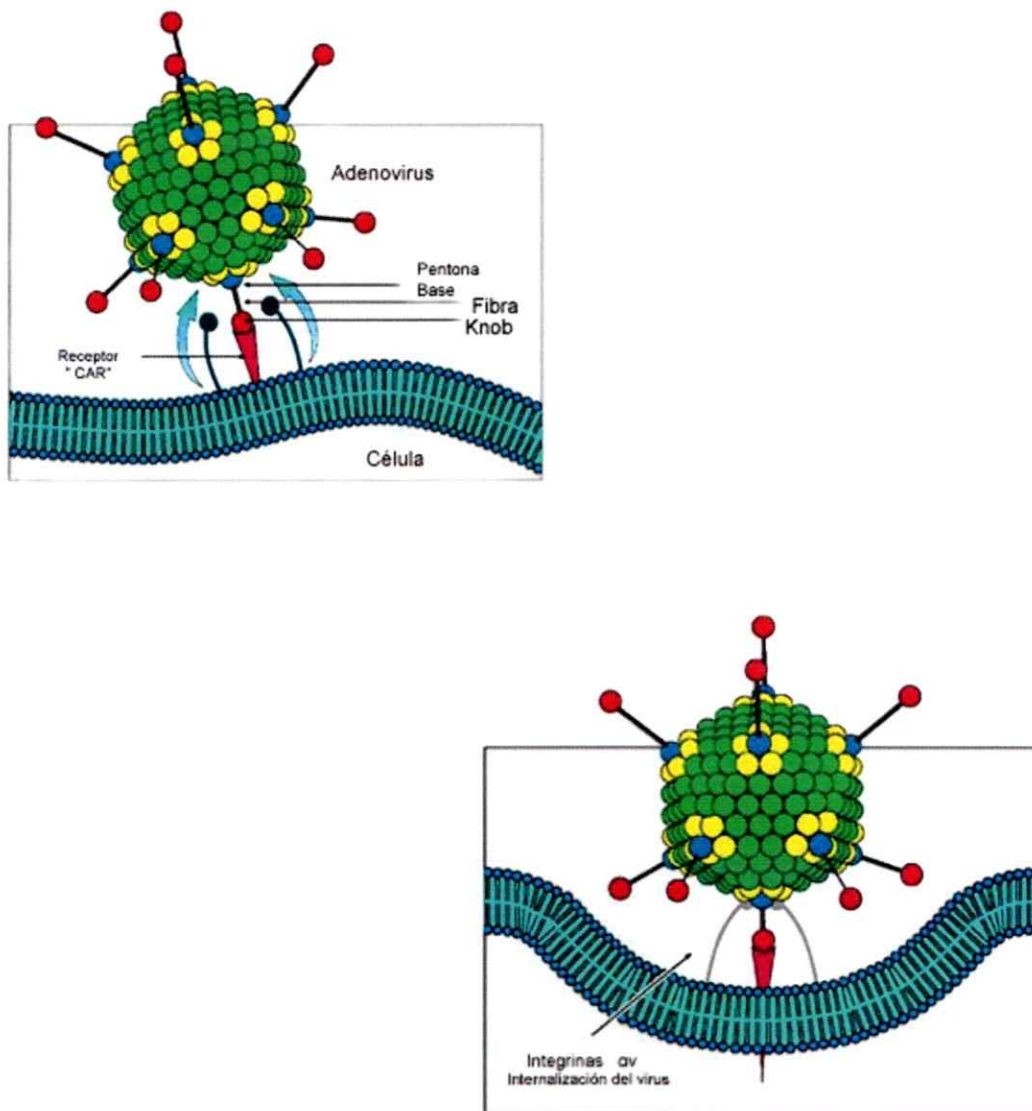


Figura 2 : Mecanismo de entrada adenovirus a la célula.

Se inicia con la unión de la proteína de la fibra del adenovirus con el receptor CAR de la célula blanco. Luego la interacción entre la pentón y las integrinas αv permiten la internalización del virus por endocitosis. El virus entra al núcleo, donde permanece como episoma.

La transcripción del DNA viral, la replicación y el empaquetado ocurren en el núcleo de la célula infectada.

Respuesta inmune provocada por los vectores adenovirales

Entre las desventajas de los vectores adenovirales se encuentra la expresión temporal de los transgenes, perdiéndose a las 3 semanas post – transferencia génica, y la inflamación del órgano blanco en el individuo tratado con estos vectores (Yang, 1994). Estos problemas no se presentan cuando los vectores adenovirales son administrados en animales recién nacidos, en órganos inmunoprivilegiados de animales adultos, o en animales atímicos, lográndose la expresión de los transgenes por más de 6 meses (Michou, 1997). En este contexto, es importante considerar que la respuesta inmune, entre otros factores, jugaría un papel importante en la expresión transiente del transgen movilizado por un vector adenoviral (Davidson, 1992).

La respuesta inmune celular hacia los vectores adenovirales comienza cuando las células dendríticas internalizan partículas vírales o fagocitan células transducidas, para enseguida migrar hacia un órgano linfoide secundario, donde presentan antígenos virales en moléculas de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) a linfocitos T CD8⁺ citotóxicos vírgenes, donde el reconocimiento específico conduce a la proliferación celular o expansión clonal de estos linfocitos. Las células dendríticas también presentan antígenos a través de moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) a los linfocitos CD4⁺ los cuales al activarse producen citoquinas importantes para la diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos.

Los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos activados se dirigen hacia el lugar de la infección, donde ocurre un segundo reconocimiento entre el receptor del linfocito T (TCR) y el antígeno presentado a través de MHC-I por la célula transducida, esta interacción característica culmina con la lisis de la célula blanco (figura 3).

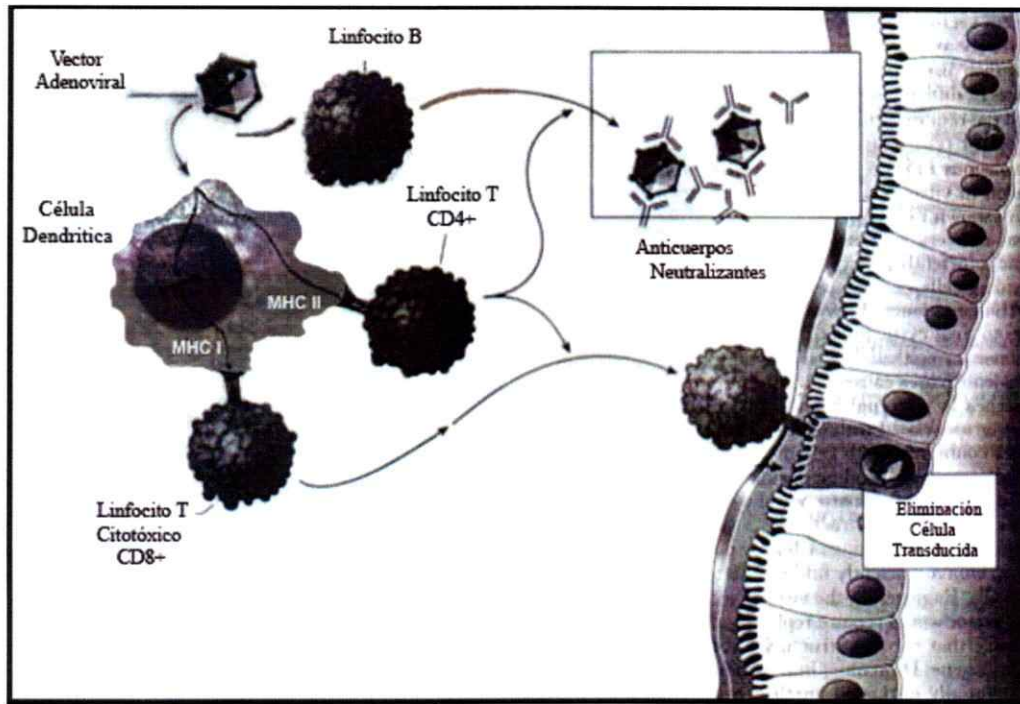


Figura 3: Respuesta inmune celular y humoral contra vectores adenovirales

Las células dendríticas presentan antígenos vírales vía MHC-I a los linfocitos T $CD8^+$ citotóxicos, y vía MHC-II a los linfocitos T $CD4^+$. Los linfocitos T $CD8^+$ se dirigen hacia el sitio de infección, reconocen los antígenos vírales en la célula transducida y la eliminan. Por su parte los linfocitos T $CD4^+$ ayudan a la diferenciación tanto de los linfocitos T $CD8^+$ como de los linfocitos B.

La infección viral también estimula a los linfocitos B, los cuales sintetizan anticuerpos contra los antígenos vírales.

Por otra parte, durante la infección viral se estimulan los linfocitos B, haciendo que estos proliferen y se diferencien en células capaces de sintetizar anticuerpos específicos que reconocen y reaccionan a los antígenos adenovirales. En consecuencia, se genera además una respuesta humoral. La producción de anticuerpos tanto contra el vector, como hacia el transgen invalida la readministración de estos, ya que durante una respuesta inmune secundaria reconocen a los vectores y eliminan a las células transducidas rápidamente (Palomo, 2002).

Para evitar las consecuencias adversas de la respuesta inmunológica en la terapia génica se han diseñado vectores adenovirales con deleciones en distintas zonas de su genoma, a fin de disminuir la expresión de las proteínas virales antigénicas. Dentro de ellos se encuentran los vectores de tercera generación que tienen toda la secuencia genómica viral delecionada (*gutless*). Sin embargo, es difícil obtener estos vectores a altas concentraciones debido a dificultades técnicas (Kochanek, 1996). Como alternativa, antes de la inyección del vector se administran pequeñas dosis de proteínas virales a través de la vía oral, para provocar tolerancia hacia estas (Ilan, 1997). Con ello, se logra aumentar el tiempo de duración de la expresión del transgen en el huésped, pero no se logra eludir completamente la respuesta inmune. Otra alternativa, consiste en el uso de inmunosupresores sistémicos farmacológicos, lo cual aumenta el tiempo de expresión de los transgenes, pero pone en riesgo la salud general del individuo (Gao, 1996).

La enzimaIDO y su relación con la tolerancia inmunológica.

La estrategia ideal para permitir la expresión de transgenes por más tiempo en las células transducidas, consistiría en inducir tolerancia inmunológica tanto hacia el vector como hacia los transgenes. La tolerancia inmunológica es la ausencia específica de respuesta del sistema inmune frente a un antígeno, ya sea propio (autoantígeno) o extraño. Esta tolerancia se podría lograr a través de la inactivación o eliminación clonal de los linfocitos T antígeno-específicos, o por la inducción de células reguladoras antígeno-específicas que generen factores que supriman la activación de las células efectoras. De esta forma, no se perdería la respuesta inmune protectora hacia otros antígenos (Weiner, 1994).

Un ejemplo de tolerancia inmunológica es lo que ocurre durante el embarazo, se ha demostrado en modelos animales, que el repertorio completo de los linfocitos T específicos de la madre (dirigidos contra antígenos de histocompatibilidad o aloantígenos del padre en el feto) es afectado en forma transiente durante el embarazo. En consecuencia, la madre logra tolerar inmunológicamente al feto (Zhou, 1998).

En la tolerancia materno-fetal, se ha descrito que estaría involucrado el metabolismo del aminoácido triptófano, tanto en el sinciotrofoblasto como en la placenta. Evidencias de lo anterior se obtuvieron al tratar animales preñados con el inhibidor farmacológico de la enzima indolamina-2,3 dioxigenasa (IDO) la cual cataboliza al aminoácido triptófano, observándose que ellos abortan sus fetos como consecuencia de la reacción inmune desencadenada por los linfocitos T de la madre (Munn, 1998).

Se conoce que IDO es una enzima intracelular de 40.000 kilodaltons (kDa) que cataliza el paso limitante de la ruta de degradación del triptófano (oxidación de triptófano a N-formilquinurenina) por la vía de la quinurenina (Taylor, 1991). Esta enzima se expresa en órganos inmunoprivilegiados como timo, mucosa del estómago, epidídimo, cámara anterior del ojo, sinciciotrofoblasto y placenta (Yoshida, 1980). También, se encuentra presente en células presentadoras de antígenos (CPA), tales como macrófagos y células dendríticas (Malina, 1996). Además, se ha descrito su presencia en células tumorales y en células expuestas a interferón gamma (IFN- γ) (Taylor, 1991). Debido a las características de los órganos y células que expresan IDO, se ha sugerido que esta enzima participaría en la mantención de la tolerancia periférica a los antígenos propios.

Los linfocitos T activados a través de la presentación de un antígeno bajo condiciones deficientes de triptófano, son capaces de sintetizar proteínas y entrar al ciclo celular. Sin embargo, ellos no pueden avanzar hacia la fase S del ciclo celular (donde ocurre la síntesis de DNA), con lo que se detiene el ciclo celular y el linfocito T entra en anergia (Munn, 1996). En consecuencia, dado que los linfocitos requieren una o más divisiones celulares para realizar sus funciones efectoras, al inhibir su proliferación también se inhibe su función (Bird, 1998).

Si al linfocito T anérgico se lo expone a un medio con triptófano, muere por apoptosis, a menos que esta exposición ocurra junto con una segunda señal provista a través del TCR (Munn, 1996).

Se ha reportado tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo* que la privación de triptófano o la presencia de catabolitos del metabolismo de este aminoácido, provocan la eliminación selectiva por apoptosis de linfocitos T alógenicos activados, sin

afectar otros tipos celulares como células dendríticas o linfocitos T helper 2 (Grohmann, 2003)

Los datos anteriores sugieren que los potenciales mecanismos a través de los cualesIDO ejercería su efecto inmunoregulatorio en los tejidos serían a través de la disminución del aminoácido como un nutriente esencial, provocando inanición celular y muerte, por apoptosis de linfocitos T activados o bien los metabolitos originados del catabolismo del triptófano (quinolinato, quinurenina, etc) actuarían directamente sobre los linfocitos T controlando su proliferación y/o supervivencia. (Moffet, 2003).

Para que ocurra este efecto supresor, debería generarse un microambiente en los tejidos con una baja concentración de triptófano, de forma similar a la hipoxia que ocurre en el tejido muscular durante el ejercicio.

HIPOTESIS DE TRABAJO

Basándose en los antecedentes descritos, proponemos que un vector adenoviral que contiene el gen IDO, disminuirá la concentración de triptófano en el medio extracelular en células transducidas eficientemente con este vector.

Este tipo vector adenoviral podría ser utilizado en el futuro como una estrategia para promover tolerancia inmunológica en células transducidas.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión y la capacidad de metabolizar triptófano en el medio extracelular de células transducidas con un vector adenoviral que contiene el gen IDO y evaluar distintos efectos celulares derivados de esta expresión.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar *in vitro* la eficiencia de la transducción y el efecto del vector en la proliferación celular.
2. Evaluar *in vivo* la magnitud y la duración de la expresión del gen reportero GFP.

MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

1.1 Células y medios

Las células 293 (ATCC, CRL157) corresponden a una línea celular de riñón fetal humano, que expresan en forma constitutiva los factores necesarios para la replicación de los vectores adenovirales. Se obtuvieron en Quantum (QBI-293^a) y fueron mantenidas en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle (Gibco BRL) suplementado con suero fetal bovino SFB 10% (v/v), en adelante D-MEM + SFB 10 %.

Las células A549 (ATCC, CCL 185 carcinoma pulmonar humano) fueron donadas gentilmente por la Dra. Marcela Ferres, Laboratorio de Infectología de la Pontificia Universidad Católica de Chile y mantenidas en medio de cultivo 199 (Gibco BRL) suplementado con SFB 10% (v/v), en adelante M199 + SFB 10 %.

Las células troncales mesenquimáticas humanas (MSC) se aislaron por el método descrito por Conget and Minguell, (1999) a partir del material sobrante de cosechas de medula ósea obtenidas de individuos sanos, que participaban como donantes en trasplantes alogénicos. Estas células fueron mantenidas en medio de cultivo Minimum Essential Medium alpha (Gibco BRL) suplementado con SFB 10%(v/v), en adelante α - MEM + SFB 10%.

Todos los cultivos celulares se mantuvieron bajo atmósfera húmeda aire/CO₂ 95/5% a 37 °C y los medios de cultivo utilizados incluían sulfato de gentamicina 80 mg/L.

1.2 Tripsinización y subcultivo

Puesto que todas las células utilizadas son adherentes, los subcultivos se realizaron tripsinizando y resembrando las células. Para ello, después de eliminar el medio de la placa de cultivo, se agregó tripsina 0.25 % (p/v) en tampón fosfato salino (PBS) a $50 \mu\text{l}/\text{cm}^2$. Se incubó 10 min a 37°C y luego se agregó medio de cultivo suplementado con SFB 10% para neutralizar la acción de la tripsina. Finalmente se centrifugaron a $600 \times g$ por 7 min a temperatura ambiente, se resuspendieron en los respectivos medios de cultivo suplementados con SFB y se sembraron a una densidad de $0.06 \times 10^6 \text{ cel}/\text{cm}^2$ para 293 y A549, $0.007 \times 10^6 \text{ cel}/\text{cm}^2$ para MSC.

2. VECTORES ADENOVIRALES

En el presente trabajo se utilizaron los vectores AdGFP y AdIDO ambos expresan GFP, pero AdIDO tiene además la secuencia codificante para la enzimaIDO humana. Ambos genes se encuentran en distintos cassettes de expresión bajo el control del promotor de CMV y terminadores del gen del gen β - actina (figura 4).

Todos los vectores recombinantes utilizados en esta tesis eran derivados del serotipo Ad5 y son deficientes en su replicación.

2.1 Construcción de vectores adenovirales

Los vectores AdGFP y AdIDO fueron construidos por la Dra Paulette Conget usando el método de Volgestein. Brevemente, se clonó el cDNA de IDO humana gentilmente donado por el Dr. Osamu Takikawa, Universidad de Wollongong Australia (Habara-Ohkubo, 1991) en vector pADTRACK bajo el promotor CMV. Por análisis de restricción se seleccionaron los clones bacterianos que poseían la secuencia IDO y se aislaron los plasmidios correspondientes. Después de linealizarlos se transfectaron en células 293 junto a otro vector que contiene el resto del genoma adenoviral (pShuttle). Los vectores adenovirales se obtuvieron a través de recombinación homóloga. A los 14 días de cultivo se evidenciaron placas de lisis en las células 293, a partir de las cuales se obtuvieron partículas virales las cuales fueron propagadas.

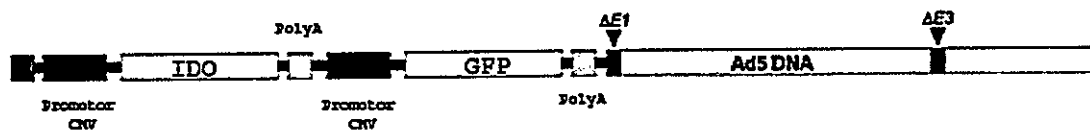


Figura 4: Vector adenoviral AdIDO linealizado

Promotor CMV: Promotor de citomegalovirus.

IDO: Indolamina 2,3 dioxigenasa

ΔE1, ΔE3: Delección gen E1 y gen E3.

Ad5 DNA: Genoma adenoviral serotipo 5.

2.2 Propagación de vectores adenovirales

Cultivos semiconfluentes de células 293 se transdujeron con las partículas virales recuperadas y resuspendidas en DMEM + SFB 2 %, incubando durante 4 h a 37 °C, se retiró el medio y se agregó DMEM + SFB 10 %. Cuando las células comenzaron a redondearse y soltarse de la placa (efecto citopático, CPE) producto de la replicación de los vectores adenovirales, el medio y las células se colectaron (aproximadamente 30h post-transducción). Después de centrifugar a 600 x g durante 10 min a temperatura ambiente, las células sedimentadas se resuspendieron en Tris-HCl 10 mM pH 8,1 y se lisaron sometiéndolas a 3 ciclos de congelación/descongelación (-80/37°C). Por último las células no lisadas y los restos celulares se eliminaron centrifugando a 600 x g durante 10 min a temperatura ambiente y los vectores adenovirales se recuperaron del sobrenadante.

2.3 Purificación de vectores adenovirales

Los vectores adenovirales se purificaron por centrifugación diferencial en gradientes de CsCl. Para ello, se preparó una gradiente de densidad agregando 1 volumen de una solución de CsCl $\rho = 1,45$ g/ml bajo un volumen de una solución de CsCl $\rho = 1,25$ g/ml. Luego, se colocaron cuidadosamente sobre la gradiente 1,8 volúmenes del sobrenadante obtenido después de lisar las células 293 transducidas y se centrifugó a 72.000 x g durante 2 h a 4 °C. Las partículas virales semipurificadas se extrajeron a partir de la banda de color blanco opaco que se encontraba en los 2/3 inferiores de la gradiente y se diluyeron a la mitad en Tris-HCl 10 mM pH 8,1 luego 1 volumen de esta dilución se colocó en una nueva gradiente preparada con 1 volumen de cada solución de CsCl y se centrifugó a 72.000 x g durante 4 horas a 4 °C. Los

vectores adenovirales purificados se extrajeron a partir de la banda de color blanco opaco localizada en los 2/3 inferiores de la gradiente.

2.4 Diálisis de vectores adenovirales

Los vectores adenovirales purificados fueron dializados con el sistema Slide-A Lyzer Cassette (Pierce). Brevemente, se colocaron los vectores adenovirales purificados en un cassette de diálisis y este dentro de un vaso de precipitado que contenía 2L de PBS a 4°C y agitación constante. El volumen de PBS se cambió a los 60 min y luego se dejó dializando 8 h adicionales.

2.5 Almacenamiento de vectores adenovirales

Los vectores adenovirales dializados se diluyeron con glicerol a una concentración final de 50%(v/v). Luego fueron alícuotados (20µl/alícuota) y se almacenaron a -80 °C. Cada alícuota fue descongelada a temperatura ambiente, utilizada en los experimentos y eliminada bajo normas de bioseguridad. En estas condiciones los vectores mantuvieron su infectividad por lo menos durante ocho meses.

2.6 Cuantificación de vectores adenovirales

Los vectores adenovirales se cuantificaron alternativamente por metodo espectrofotométrico o en función de las unidades formadoras de placa (pfu) En el primer caso, se determinó la absorbancia a 260 nm de una dilución 1/50 de los vectores adenovirales y se calculó la concentración de partículas virales utilizando la fórmula:

$$\text{Concentración (partículas virales/ml)} = A_{260} \times 10^{12} \times 50$$

La infectividad de los vectores adenovirales se determinó también por el método de dosis infectiva 50 (Tissue Culture Infectious Dose 50, TCID₅₀; Singh, 1976). Para ello, los stock de vectores adenovirales se diluyeron 100 veces y luego, se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} - 10^{-8}) en DMEM + SFB 2%(v/v). Además, en el mismo medio de cultivo se preparó una suspensión de células 293 a una densidad de 10^5 células/ml. En pozos de $0,3 \text{ cm}^2$ (microplaca de 96 pozos), se agregaron 100 μl de la suspensión celular y 100 μl de las diluciones y se incubaron durante 10 días a 37 °C. Después de lo cual, las placas se visualizaron en microscopio de luz invertido y se evaluó el efecto citopático (CPE).

Puesto que para cada dilución se sembraron 10 pozos, la razón de infección para dicha dilución puede expresarse como el número de pozos que presentan CPE dividido por 10. Por su parte, el título de la dilución 1/100 de los stocks de vectores adenovirales se calculó a partir de la suma de las razones obtenidas para las 8 diluciones ensayadas (S), aplicando la fórmula:

$$\text{título (TCID}_{50}/\text{ml)} = 10^{S+1,5}$$

Puesto que el título obtenido por este método es 0,7 log mayor que el obtenido en los ensayos de placa, para expresar los resultados de la titulación en la forma convencional (unidades formadoras de placas (pfu)/ml) bastaría con corregir el resultado anterior de la siguiente forma:

$$\text{título (pfu/ml)} = 10^{S+0,8}$$

Finalmente, para obtener el título del stock propiamente debe multiplicarse el título anterior por 100.

3. TRANSFERENCIA GÉNICA MEDIADA POR VECTORES ADENOVIRALES *IN VITRO*.

3.1 Transducción de células adherentes con vectores adenovirales

Cuarenta y ocho horas antes de la transducción se sembraron las células a una concentración de $0,25 \times 10^6$ cel/ cm² en medio de cultivo + SFB 10 %. Luego, las células se sembraron y se transdujeron en medio de cultivo + SFB 2%(v/v) con los vectores adenovirales a una multiplicidad de infección (MOI) de 50 (pfu)/cel. Después de una incubación de 3 horas a 37°C se retiró el medio agregándose medio de cultivo suplementado con SFB 2%(v/v).

3.2 Evaluación de la eficiencia de transducción de vectores adenovirales en función de la expresión del transgen reportero GFP.

Se realizó un recuento diferencial de las células GFP positivas. Para ello las células fueron tripsinizadas, centrifugadas 600 x g por 10 min a temperatura ambiente y resuspendidas en PBS. Se tomó una alícuota representativa y se realizó un recuento en la cámara de Neubauer, analizando las células en un microscopio de epifluorescencia marca Axioskop Zeiss con lámpara de mercurio. El recuento de células GFP positivas (verdes) se realizó en campo oscuro con filtro para fluoresceína N° 9 (excitación a 470 nm, emisión 520nm.) y en campo claro el de células totales.

La eficiencia de transducción se calculó según fórmula:

$$\text{Eficiencia de transduccion (\%)} = \frac{\text{células GFP positivas}}{0.2 \times 10^6} \times 100$$

3.3 Análisis expresión transgen IDO

3.3.1 RT-PCR para IDO

3.3.1.1 Aislamiento de RNA

Las células fueron transducidas con los vectores adenovirales a una MOI de 50 pfu/cel, 48 h post- transducción se eliminó el medio de cultivo de las placas, las células se lavaron con PBS, se tripsinizaron incubando a temperatura ambiente hasta que las células se redondearon sin soltarse, se eliminó la tripsina y se lavaron con PBS. Finalmente se centrifugaron a 700 x g durante 8 min a temperatura ambiente y se lavaron con PBS centrifugando a 300 x g durante 5 min a temperatura ambiente.

La extracción de RNA total se realizó utilizando el Kit SV Total RNA Isolation System (Promega). Brevemente al pellet con 1.5×10^6 de células, se añadió 175 μ l de una solución de lisis que contenía tiocianato de guanidina 4M + Tris (pH 7.5) 0.01M + β -mercaptoetanol 0.97 % (v/v). Después de centrifugar a 12.000 x g durante 10 min a temperatura ambiente para eliminar los precipitados de proteínas y los restos celulares, el RNA se precipitó con 0,4 volúmenes de etanol 95% (v/v) y se unió a una membrana de sílica centrifugado a 12.000 x g durante 1 min. a temperatura ambiente. Para eliminar el DNA genómico contaminante, se agregó directamente a la membrana de sílica DNAsa I libre de RNAsa y se incubó 15 min a temperatura ambiente. Finalmente, el RNA unido a la membrana se lavó con Acetato de Potasio 60 mM, Tris-HCl (pH 7.5) 10 mM, etanol 60% (v/v) y se eluyó de la membrana se sílica con agua libre de nucleasas. El RNA purificado fue mantenido a -70 °C.

3.3.1.2 Cuantificación de RNA

La cuantificación del RNA purificado se hizo espectrofotométricamente, para ello se tomó una alícuota representativa se diluyó 1/10 con agua libre de nucleasas y se midió su absorbancia a 260nm en un espectrofotómetro GeneQuant Pharmacia calculándose la concentración a partir de la siguiente relación:

$$\text{ssRNA (ug/ml)} = A_{260} \times 40 \times 10$$

El rendimiento promedio obtenido fue de 5- 10 ug/10⁶ células.

La pureza del RNA se estimó determinando simultáneamente la absorbancia a 260nm y a 280 nm. Se consideraron puros aquellos RNA que presentaban un cociente A260/A280 entre 1.7 y 2.1.

3.3.1.3 Transcripción reversa

La transcripción reversa se realizó utilizando el kit Reverse Transcription System (Promega). Brevemente en un volumen final de 20 ul se agregaron RNA total 450 ng, MgCl₂ 5 mM, una mezcla de dNTPs 1uM, oligo (dT) 0,5 ug (10 mM), transcriptasa reversa AMV 15 unidades/μg , RNAsina recombinante 20 unidades y tampón de reacción para transcripción reversa que contiene Tris HCl 10mM (pH 8.8), KCl 50mM, Tritón X-100 0,1%. La reacción se incubó durante 15 min a 42 °C para la transcripción reversa se calentó 5 min a 95 °C y se incubó 5 min a 0 °C para inactivar la transcriptasa reversa AMV. El cDNA de cadena simple así generado se almacenó a -20 °C.

3.3.1.4 PCR

La PCR se realizó con el Kit LightCycler - DNA Master SYBR Green I (Roche). Brevemente en un volumen final de 20 μl se agregaron 90 ng de cDNA, MgCl₂ 4,125

mM, mix LightCycler - DNA Master SYBR que contiene DNA polimerasa Taq, tampón de reacción, mix dNTP (con dUTP en vez de dTTP) , SYBR Green Dye, cada uno en concentración determinada por el fabricante, partidores sentido y antisentido 0.5 uM para cada gen (Tabla 1).

Las condiciones de amplificación tanto para GADPH como para IDO fueron: desnaturación 30 seg a 95 °C 1 ciclo; amplificación 0 seg a 95 °C, 5 seg a 55 °C, 0 seg a 72 °C 40 ciclos; curva de melting 0 seg a 95 °C, 30 seg a 65 °C, 0 seg a 95 °C 1 ciclo; enfriamiento, 30 seg a 40°C 1 ciclo.

Los resultados de la reacción de PCR se analizaron en función de la temperatura de meeting (T_m) y por el tamaño de los amplificados.

3.3.1.5 Análisis electroforético

Los productos de PCR se cargaron en geles de agarosa 2 %(p/v) en solución buffer Tris-Acetato-EDTA 10x (TAE). La electroforesis fue realizada a una corriente constante de 50 mA durante 1 hora a temperatura ambiente. Se utilizó como estándar de peso molecular DNA Ladder 1Kb Bio Labs. Los geles se visualizaron en un transiluminador UV (312 nm) después de teñir con solución de bromuro de etidio 10 ug/ml en TAE durante 15 minutos y se fotografiaron con cámara digital Kodak.

Como control negativo de la reacción de PCR se utilizó agua en vez de cDNA y como control positivo de la reacción de PCR para IDO se utilizó el plasmidio donde originalmente fue clonado el cDNA de IDO.

TABLA 1. Partidores utilizados para evaluar la expresión génica de GADPH e IDO. Se indica la pareja de partidores usados (5' - 3'), la Tm y el tamaño del amplificado generado (pb) .

Gen	Gene ID	partidor sentido	partidor antisentido	Tm °C	Tamaño amplicón (pb)
GADPH	2597	accacagtcctg ccatcac	tccaccaccctgtgct gta	79.8	540
IDO	3620	tgaccggcttgat gctatc	cagtgtgagccaggat atag	89	1200

3.3.2 Actividad enzimática de IDO.

Para verificar la expresión funcional de IDO, el triptófano de los medios de cultivo celular fue medido por espectrofluorimetría utilizando el método de Bloxam y Warren (1974). Brevemente las proteínas de los medios de cultivo celulares fueron precipitadas con una solución de ácido tricloroacético (TCA) en agua destilada al 20% (v/v) se centrifugó a $14000 \times g$ 5 min a TA. Luego se derivatizó el triptófano, para ello se tomó el sobrenadante y se agregó solución de TCA en agua destilada al 10% (v/v), formaldehído en agua destilada al 1,8% (v/v) y $FeCl_3$ 6 mM en solución ácido tricloroacético al 10% (p/v). Se calentó durante 2 horas a $90^\circ C$ en baño de agua.

La cuantificación se realizó midiendo la absorbancia del producto de la reacción en un espectrofluorómetro Shimadzu RF-5000, equipado con lámpara de Xenon a una excitación 360 nm y emisión 450 nm. Los valores de fluorescencia de la muestra fueron interpolados en una curva estándar realizada con concentraciones de triptófano conocidas y preparada para cada experimento. Cada punto de la curva se realizó en duplicado, con un r de la curva = 0.99.

4. TRANSFERENCIA GÉNICA MEDIADA POR VECTORES ADENOVIRALES *IN VIVO*

4.1 Animales

Para los experimentos *in vivo* se utilizaron ratones inmunocompetentes Balb/c, de 3 meses, que se mantuvieron durante todo el tiempo que duraban los experimentos en un bioterio a temperatura constante de 25 °C, bajo condición libre de patógenos según las normas internacionales.

4.2 Administración vectores adenovirales

Los vectores adenovirales fueron inyectados por vía endovenosa, para lo cual 3×10^9 pfu se diluyeron en 200 μ l de PBS y se cargaron en una jeringa de 1 ml, con aguja 21G 1/2. Los animales fueron mantenidos en ambiente aislado térmicamente a 27 °C, luego fueron inmovilizados en una trampa que permitía mantener al animal quieto y con su cola expuesta, para permitir la vasodilatación de la vena de la cola.

4.3 Obtención de cortes histológicos

A los 7, 14, 21, días post- inyección los ratones fueron sacrificados por sofocación con éter y se disecaron su hígado y bazo en ambiente libre de nucleasas y estéril.

Un trozo de cada lóbulo hepático de cada ratón (total 3/ratón) fue embebido en solución de polietilenglicol (O.C.T Compound), congelado en baño de hexano/hielo seco y guardado a -80 °C. Luego se obtuvieron las criosecciones de 8 μ m de espesor en un criostato marca Tissue Tek modelo 4554-220 a -20 °C y se adhirieron a porta objetos pretratados en una solución de gelatina 10% (p/v) y sulfato crómico potásico 1M como fijador. Las muestras histológicas se guardaron a 0 °C hasta su análisis.

4.4 Evaluación transducción de vectores adenovirales en función de la expresión del transgen reportero GFP.

Para evaluar la transducción *in vivo* de los vectores adenovirales se analizó sobre 7 cortes al azar de cada lóbulo (21 cortes/animal) la expresión de GFP en cortes histológicos de hígado de los animales inyectados, los cuales se montaron utilizando medio de montaje que contenía alcohol polivinílico (Mowiol 4-88, Calbiochem) 9% (p/v) y 1,4-diazobenceno-(2.2.2)-octano (DABCO) 2.5 % (p/v). Inmediatamente después las muestras se analizaron en microscopio de epifluorescencia.

RESULTADOS

Evaluación *in vitro* de la eficiencia de transducción de los vectores adenovirales AdGFP y AdIDO en células A549 y MSC

Las células A549 y MSC fueron transducidas con los vectores adenovirales AdGFP y AdIDO a una MOI = 50 pfu/cel, y 48 h post transducción se determinó la eficiencia de la transducción en función del porcentaje de células que expresaban el gen reportero GFP.

Como muestra la figura 5, el porcentaje de expresión de GFP fue menor para las células MSC transducidas tanto con el vector AdGFP ($12,5 \pm 3,75$) como con el vector AdIDO ($15,1 \pm 5,2$), en comparación con las células A549 transducidas con el vector AdGFP ($53,9 \pm 8,66$) y con el vector AdIDO ($56,6 \pm 9,1$).

Estos resultados sugieren que ambos vectores transducen estas células humanas y expresan el transgen GFP, con una mayor eficiencia en las células A549 que en las células MSC.

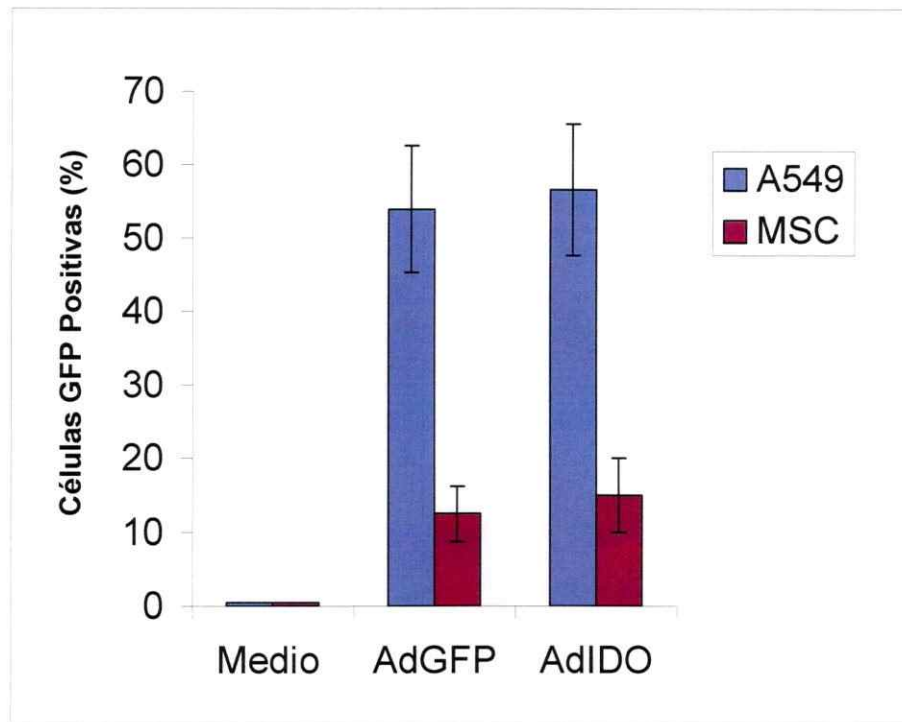


Figura 5: Transducción de células A549 y MSC mediada por vectores adenovirales AdGFP y AdIDO.

Las líneas celulares A549 y MSC fueron transducidas con los vectores adenovirales AdGFP y AdIDO a una MOI = 50 pfu/cel. 48 horas post-transducción las células se analizaron por microscopia de epifluorescencia para detectar la expresión de GFP.

Los graficos representan la media \pm DE de 5 experimentos independientes.

Determinación de la expresión del transgenIDO movilizado en el vector adenoviral AdIDO en células A549

Las células A549 fueron transducidas con los vectores adenovirales AdGFP y AdIDO (MOI= 50 pfu/cel), y 48h post-transducción se analizó la expresión del transgenIDO determinando la presencia de su mRNA, a través de RT-PCR en tiempo real.

La figura 6 muestra el análisis de electroforesis de los amplificados obtenidos. Aquellas células transducidas con el vector AdIDO presentaron un amplificado de 1200 pb, del mismo tamaño que el obtenido en el control positivo (plasmidio que contenía el genIDO). Ambos amplicones presentaron idénticas temperaturas de melting (T_m) correspondientes a 89 °C

Como se esperaba, no se obtuvo amplificación en aquellas células que no fueron transducidas (medio de cultivo) o que recibieron el vector AdGFP.

Es importante destacar que todos los mRNA obtenidos fueron amplificables, ya que se observó amplificación para la enzima gliceraldehido fosfodeshidrogenasa (GADPH) cuyo amplificado corresponde a 540pb.

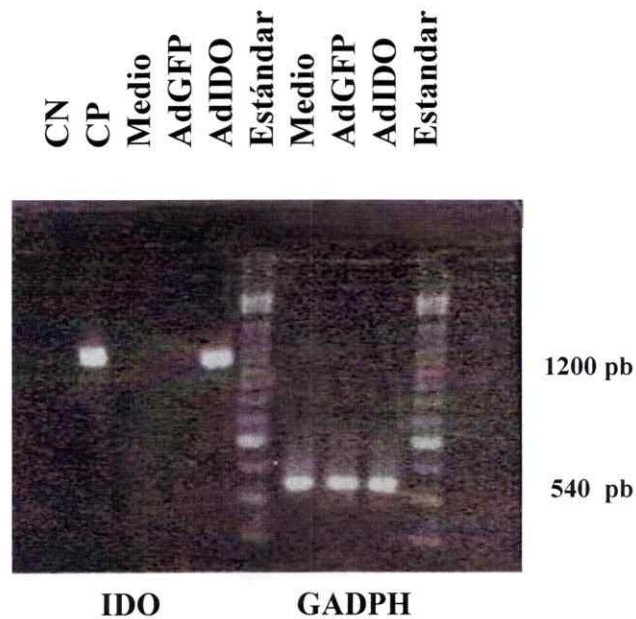


Figura 6: Expresión del gen IDO en células A549 transducidas con el vector AdIDO.

Células A549 fueron transducidas con los vectores adenovirales AdIDO y AdGFP, MOI = 50 pfu/cel. 48 horas post-transducción, se aisló el mRNA de ellas y se realizó RT-PCR en tiempo real (Lightcycler) para el gen IDO y para el gen GADPH.

El resultado de la reacción de amplificación fue analizado teniendo en cuenta el tamaño del amplificado en pb. Como control positivo (CP) se utilizó un plasmidio que contenía el gen IDO, y como control negativo (CN), se utilizó agua libre de nucleasas.

El amplificado de 540 pb corresponde al gen GADPH, y el de 1200 pb al gen IDO.

Determinación *in vitro* de actividad de la enzima IDO, a través de su función catalítica

Las células A549 y MSC fueron transducidas con los vectores adenovirales AdGFP y AdIDO a una MOI = 50 pfu/cel. 2, 4 y 6 días post-transducción se cuantificó la concentración de triptófano en los medios de cultivo.

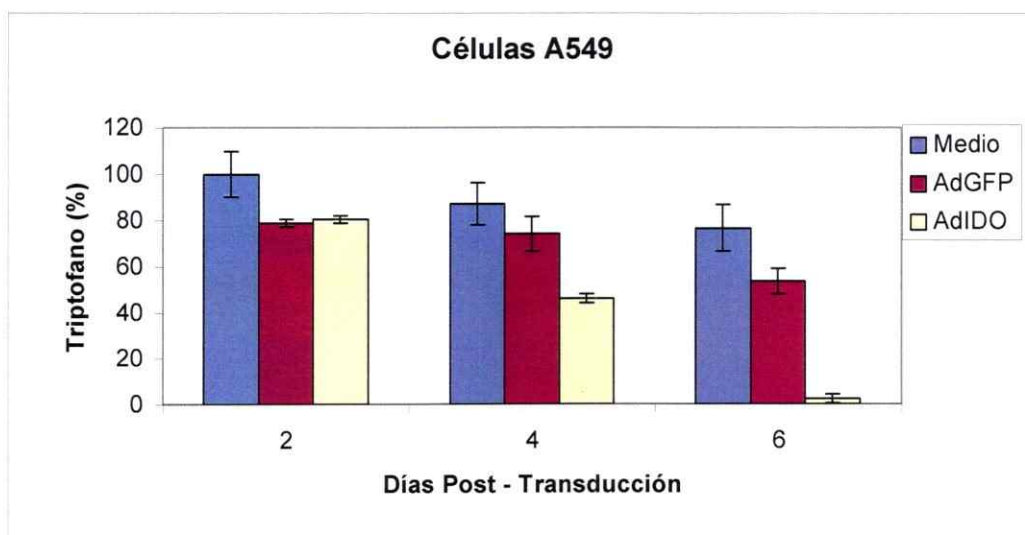
Tal como se muestra en la figura 7A las células A549 transducidas con el vector AdGFP presentan un $79\% \pm 1,44$ de la concentración de triptófano respecto a las células sin transducir en el día 2 post-transducción. En el día 4 post-transducción es de $74,2\% \pm 7,56$ mientras que en el día 6 post-transducción, es del $53,7\% \pm 5,58$.

Estas mismas células transducidas con el vector AdIDO, presentan una concentración de $80,4 \pm 1,53\%$ del aminoácido, respecto a las células sin transducir el día 2 post-transducción. Al día 4, post-transducción la concentración es de $46,2\% \pm 2,04$. Finalmente, hacia el día 6 post-transducción, la concentración es de $2,3\% \pm 1,91$.

La figura 7B muestra que las células MSC transducidas con el vector AdGFP, presentan una concentración de $71,8\% \pm 8,13$ de triptófano respecto a las células sin transducir en el día 2 post-transducción. El día 4 post-transducción, es de $60,5\% \pm 6,60$, y al día 6 post-transducción del $51,8\% \pm 5,68$.

Cuando se transdujo las células MSC con el vector AdIDO, el día 2 post-transducción la concentración del triptófano en el medio de cultivo es un $73,5\% \pm 5,74$ respecto a las células sin transducir. Al día 4 fue de $38,92\% \pm 2,75$, y finalmente hacia el día 6 post-transducción fue de $21,84\% \pm 1,95$.

A



B

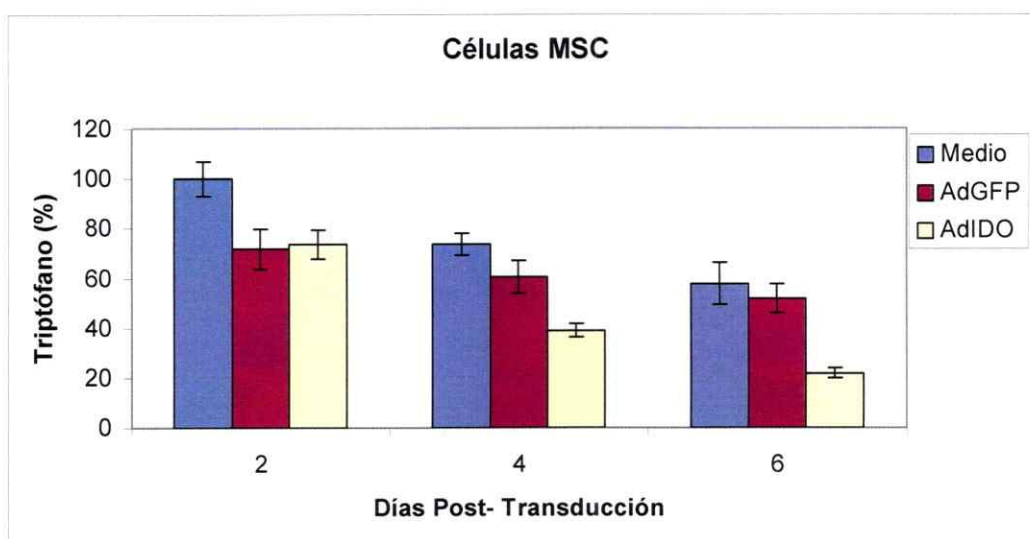


FIGURA 7: Cinética de catálisis de triptófano en células transducidas con los vectores AdGFP y AdIDO.

Las células A549 y MSC fueron transducidas con: medio de cultivo, AdGFP y AdIDO, (MOI=50pfu/cél). 2, 4 y 6 días post-transducción se determinó la concentración de triptófano en los medios de cultivo, por espectrofluorimetría.

Los gráficos representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes.

Por lo tanto hay expresión del transgenIDO en aquellas células transducidas con el vector AdIDO, esta enzima es funcional y produce depleción de triptófano en los medios de cultivo.

Efecto de la expresión del genIDO sobre la proliferación de las células A549 y MSC transducidas con los vectores AdGFP y AdIDO

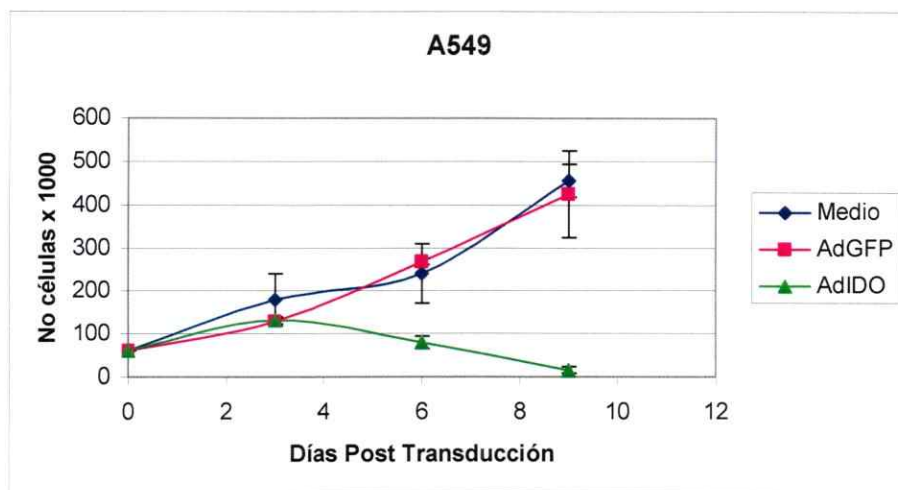
Debido a que la infección y la expresión del genIDO podrían provocar algún efecto en la proliferación de las células transducidas, se realizaron recuentos celulares durante 11 días post-transducción con los vectores adenovirales, y se compararon con las células no infectadas.

En la figura 8A, se observa que las células A549 transducidas con el vector AdIDO presentan una inhibición de la proliferación celular luego de 6 días post-transducción. Por otra parte, en las células MSC transducidas con el mismo vector no se observa inhibición en la proliferación celular (Figura 8B).

Por lo tanto, el efecto de la expresión de la enzimaIDO sobre la proliferación celular dependería del tipo celular.

De los datos obtenidos se puede decir que la enzimaIDO es funcional y metaboliza triptófano en el medio de cultivo de las células transducidas con el vector AdIDO y que la expresión deIDO tiene un efecto inhibitorio en la proliferación celular de A549, pero no de MSC.

A



B

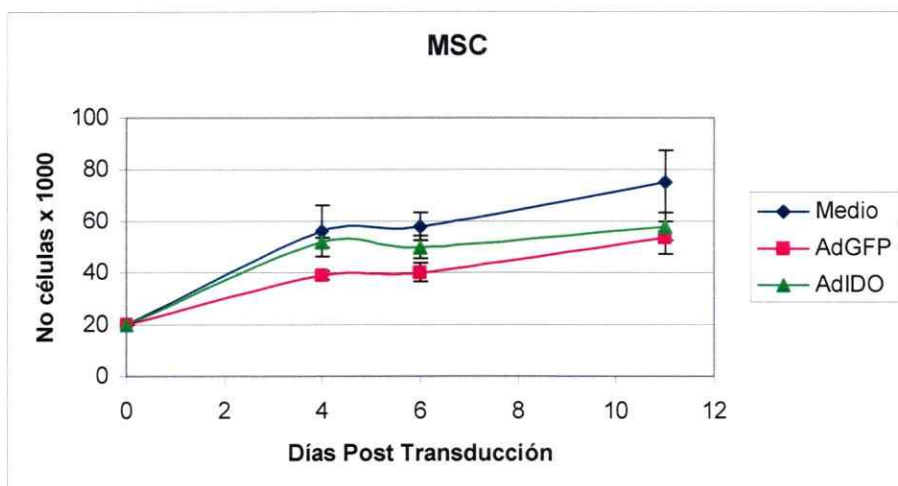


Figura 8: Efecto de la expresión del gen IDO sobre la proliferación de las células A549 y MSC.

Células A549 y MSC fueron transducidas con los vectores AdGFP y AdIDO, MOI= 50pfu/cél. A distintos tiempos post-transducción se determinó la proliferación de estas células a través de recuento celular con azul tripan.

Los gráficos representan la media \pm DE de 3 experimentos independientes.

Transducción hepática mediada por los vectores adenovirales AdGFP y AdIDO

Para determinar si los vectores eran capaces de transducir hepatocitos *in vivo*, ratones inmunocompetentes recibieron por inyección: PBS, AdGFP ó AdIDO, (a una concentración de 3×10^9 pfu/animal). Posteriormente, los animales fueron sacrificados a los 7, 14 y 21 días post-inyección, y se analizó la expresión de GFP a través de microscopia de epifluorescencia en criosecciones obtenidas de hígados de los distintos animales.

Como se muestra en la Figura 9, solo aquellos animales que recibieron los vectores adenovirales expresaron GFP. 7 días post-inyección se observa una baja expresión de GFP tanto en los animales que recibieron el vector AdGFP como el vector AdIDO. Sin embargo, la expresión del transgen reportero aumenta hacia el día 14 post-inyección, donde se logra el máximo de expresión con gran parte del tejido expresando GFP, y luego disminuye nuevamente a una baja expresión el día 21 post-inyección, en ambos vectores siendo la disminución menor en el caso del vector AdGFP.

En resumen, ambos vectores AdGFP y AdIDO fueron capaces de transducir hepatocitos de ratón *in vivo*.

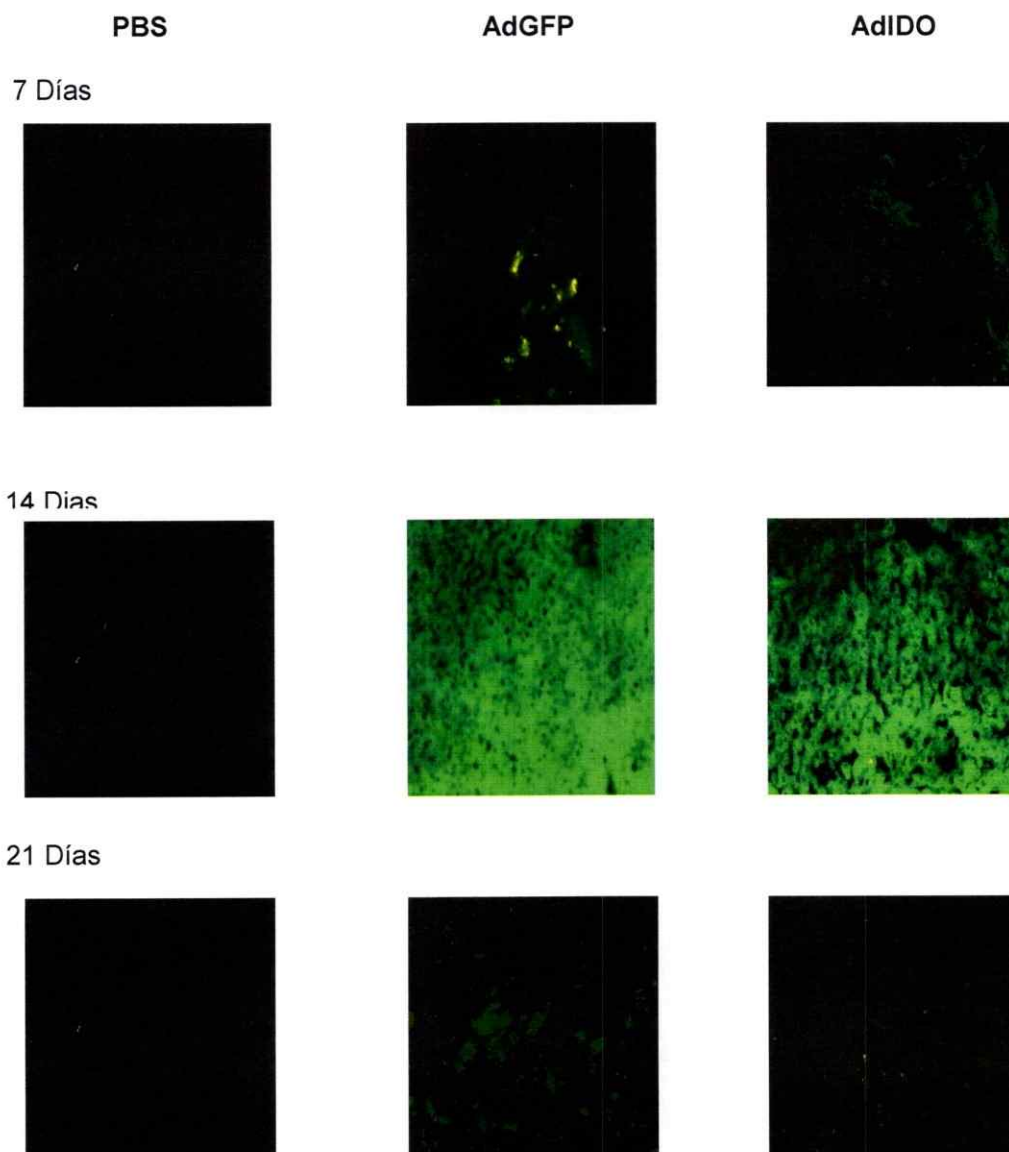


Figura 9: Expresión del transgen reportero (GFP) en cortes histológicos de hígados de animales inyectados con los vectores AdGFP y AdIDO.

Ratones balb/c hembras de 3 meses de edad recibieron por vía intravenosa el vehículo de inyección (PBS) o 3×10^9 pfu/animal de los vectores AdGFP o AdIDO. Los animales fueron sacrificados 7, 14 y 21 días post-transducción, el hígado fue extraído y se realizaron criosecciones de cada uno de los lóbulos hepáticos, los cuales se analizaron por microscopía de epifluorescencia para determinar GFP.

Se analizaron 4 animales por grupo, 21 cortes al azar de cada hígado/animal.

El aumento de las microfotografías corresponde a 132x.

Infiltración celular en tejido hepático de animales inyectados con los vectores adenovirales AdGFP y AdIDO

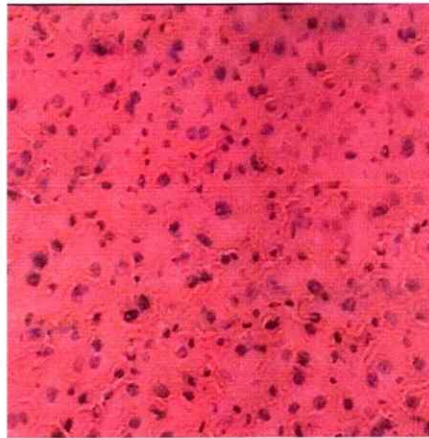
Para evaluar si la pérdida del transgen GFP en el hígado de los ratones pudo deberse a algún tipo de respuesta inmune celular, cortes de hígado obtenidos de ratones inyectados con los vectores AdGFP y AdIDO (3×10^9 pfu/animal) y sacrificados 7, 14 y 21 días post inyección, fueron sometidos a tinción hematoxilina – eosina, y luego analizados por microscopía óptica. Las secciones fueron evaluadas de la siguiente forma; graduación "0": corresponde a tejido normal, graduación "1": infiltración celular local, graduación "2": infiltración celular y necrosis, graduación "3": disrupción de la arquitectura del tejido y zonas extensas de infiltración celular.

Como se muestra en la Figura 10, el día 14 post-inyección, el corte de hígado de los ratones inyectados con PBS presenta una graduación 0, sin disrupción de tejido y arquitectura celular homogénea, en tanto con el vector adenoviral AdGFP el corte de tejido muestra grupos de infiltración celular asociados principalmente a los capilares con células presentando efecto citopático (graduación 2). Por su parte el animal inyectado con el vector AdIDO presenta una zona de gran infiltración celular en medio del tejido hepático (graduación 1).

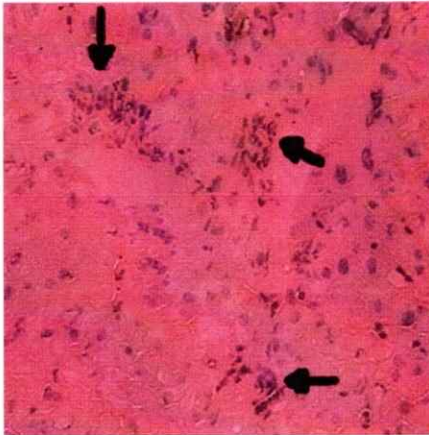
En consecuencia, independiente de cual sea el vector inyectado los animales presentan agrupaciones de células infiltrantes.

En resumen los animales transducidos con los vectores adenovirales AdGFP y AdIDO *in vivo*, presentaron una expresión mínima de GFP a los 21 días post-transducción e infiltración celular. Estos datos sugieren una respuesta inmune de parte del huésped hacia ambos vectores.

PBS



AdGFP



AdIDO

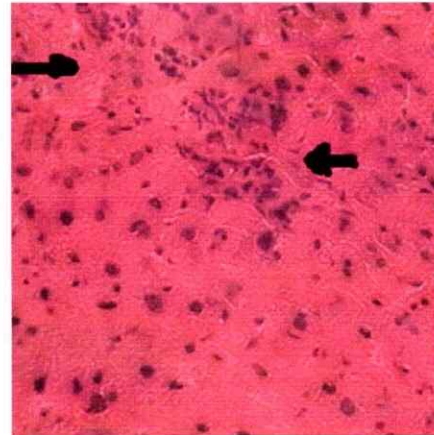


Figura 10: Infiltración celular en hígado de animales transducidos con los vectores AdGFP y AdIDO 14 días post-inyección.

Ratones balb/c hembras de 3 meses de edad recibieron por vía intravenosa el vehículo de inyección (PBS) o 3×10^9 pfu/animal de los vectores AdGFP y AdIDO. Los animales fueron sacrificados, se extrajo el hígado y se obtuvieron criosecciones de cada uno de los lóbulos hepáticos, sometiéndolos a tinción hematoxilina eosina y fueron observados en microscopio óptico. Las flechas indican zonas de agrupaciones celulares infiltrantes en el tejido hepático.

El aumento de las microfotografías corresponde a 238x.

DISCUSIÓN

Los vectores adenovirales presentan múltiples ventajas para su utilización en terapia génica, sin embargo la respuesta inmune del huésped provocada hacia estos limita la expresión de los transgenes en el tiempo, e impide la readministración de los vectores adenovirales.

Para evitar que los vectores adenovirales sean eliminados por el sistema inmunológico del huésped se han utilizado principalmente dos tipos de estrategia. Por un lado, aquellas que deprimen inmunológicamente al huésped, y por otro lado aquellas que modifican el genoma de los vectores adenovirales con el fin de disminuir su potencial antigénico.

Cualquiera sea la estrategia utilizada, lo ideal es inducir tolerancia inmunológica en el huésped hacia el vector adenoviral y a los trasgenes movilizados por este. Esto significa eliminar el repertorio de linfocitos T que reconocen estos antígenos, que son los que finalmente eliminan a las células que han sido transducidas.

Se ha propuesto, sobre la base del modelo de tolerancia inmunológica de la madre respecto del feto alogénico, el cual está ligado a la acción de la enzimaIDO, que esta enzima sería importante para mantener también la tolerancia periférica hacia los autoantígenos. La enzimaIDO al metabolizar triptofano produciría anergia en los linfocitos T que han sido activados en condiciones de baja concentración de este aminoácido.

Expresión de transgenes de vectores adenovirales *in vitro*

El menor porcentaje de transducción de las células MSC, respecto de las células A549 (figura 5), para una misma MOI fue esperado, ya que trabajos anteriores habían demostrado que las células MSC presentan una baja expresión del receptor de unión a adenovirus CAR (Conget, 2000), y la eficiencia con la que los vectores adenovirales transducen a las células depende en gran medida en la expresión de este receptor.

La presencia del amplificado para la enzimaIDO, solo en aquellas células que recibieron el vector AdIDO, indicaría que este proviene del vector adenoviral, y además significaría que las células A549 no expresan, o lo hacen a un nivel bajo, esta enzima en respuesta a una infección adenoviral. Por lo tanto, los efectos derivados de la expresión de la enzimaIDO provienen del transgen movilizado por el vector adenoviral y no por una expresión endógena de esta enzima.

Respecto de la cuantificación de triptófano en los medios de cultivos, hay una disminución de alrededor de un 20% respecto de las células no transducidas, el día 2 post-transducción, que es independiente del tipo celular o del vector adenoviral utilizado (figura 7). Esta disminución se puede deber al mismo proceso de transducción y a la expresión, tanto de proteínas virales, como a los transgenes movilizados, ya que desde el día 2 post-transducción es posible determinar expresión de GFP en las células transducidas.

La disminución en la concentración de triptófano en los medios de cultivo asociada aIDO, es detectable de forma importante en los medios de cultivo desde el día 4 post-transducción, tanto en las células A549, como en las células MSC, y la concentración del aminoácido continúa disminuyendo el día 6 post-transducción. Este

retraso con respecto a la expresión del gen reportero, el cual ya es detectable 24 hrs. post-transducción, se debería a que la enzima tiene una baja actividad catalítica. A medida que se produce una mayor cantidad de enzima, la metabolización de triptófano es más eficiente. Esto ya ha sido descrito en los sistemas *in vivo* en los que las células que expresan IDO, pueden aumentar los niveles de expresión de la enzima 1000 veces como respuesta a una señal estimuladora, y lograr así una degradación efectiva del triptófano en el medio en poco tiempo (Fujigaki, 2000).

El efecto sobre la proliferación en las células A549 (las que presentan un ciclo celular de 3 días aprox.) transducidas con AdIDO, se aprecia desde el día 4 post-transducción llegando a un mínimo en el número de células al día 6, lo que coincide con la disminución de triptófano en el medio de cultivo ya que el día 6 post transducción hay un 2% de la concentración de triptófano inicial (figura 8A). Esta disminución en la proliferación podría deberse a la falta de triptófano como aminoácido esencial y/o a la presencia de metabolitos secundarios originados de la degradación de triptófano.

El efecto antiproliferativo observado en las células A549, no ocurre en las células MSC (ciclo celular de 4 días aprox), transducidas con el vector AdIDO (figura 8B), ya que la pendiente se mantiene similar a las células no transducidas a pesar de que también los medios de cultivo disminuyeron su concentración de triptófano.

Que las células MSC no se vean afectadas por la disminución de triptófano en los medios de cultivo, podría deberse a que se ha descrito que estas células pueden expresar IDO al ser estimulada con IFN- γ (Meisel, 2004), y podrían presentar alguno de los mecanismos que se ha observado en este tipo de células como mecanismo defensivo ante la deprivación de triptófano. Por ejemplo el aumento en la expresión de la triptofanil tRNA sintetasa, lo que les permitiría competir de forma preferencial por el

triptófano cuando la concentración de este aminoácido es baja en el medio (Fleckner, 1988).

Expresión del transgen GFP de vectores adenovirales *in vivo*

Como una primera aproximación de la utilización de este vector en un sistema *in vivo* se estudió la expresión del transgen reportero GFP, en el hígado de los ratones transducidos.

El máximo de expresión del transgen GFP fue a los 14 días para ambos vectores (figura 9), lo cual ya ha sido observado en otros trabajos anteriores (Yang, 1994c).

En relación a la duración del transgen reportero, los resultados obtenidos en los animales transducidos con el vector AdGFP, fueron los esperados para vectores de primera generación, en los cuales la expresión de los transgenes disminuye al mínimo dentro de los 21 días post-transducción, debido a la eliminación de las células transducidas y a que estas son reemplazadas por nuevas células que no expresan transgenes (Yang, 1994b). Sin embargo, los animales transducidos con el vector AdIDO también presentaron una disminución del transgen, lo que podría deberse a la pérdida por activación inmunológica en estos animales.

Las agrupaciones celulares infiltrantes que muestran los cortes de hígado sometidos a tinción hematoxilina – eosina podrían corresponder a linfocitos CD8+ citotóxicos (figura 10). Si bien esto no fue confirmado en este trabajo, lo reportado en literatura es que la infiltración de este tipo de células y la inflamación del tejido son características de la respuesta inmune en células hepáticas transducidas con vectores adenovirales.

Si es que hubo respuesta inmune hacia las células transducidas con el vector AdIDO, esto podría deberse a que: a) según los datos obtenidos de la transducción *in vitro*, el nivel de triptófano no se diferencia entre ambos vectores si no hasta el día 4 post transducción. Este retraso puede haber permitido la respuesta inmune, ya que los linfocitos pudieron ser activados en un ambiente en presencia de triptófano. b) El hígado es capaz de expresar la enzima triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO), la cual también cataboliza triptófano con una actividad enzimática mayor que IDO. Así este órgano puede no ver afectada su respuesta inmune ante las variaciones en la concentración de triptófano, con mecanismos de defensa similares a los descritos para las células que expresan IDO.

Proyecciones

Los datos obtenidos en este trabajo permitirán avanzar hacia un segundo paso en el estudio del vector adenoviral AdIDO, el cual sería evaluar si este es capaz de inhibir la activación de células inmunológicas, tanto en ensayos *in vitro*, como en ensayos *in vivo*. Según estos datos, es importante considerar el tipo de célula en la cual estos vectores son transducidos, ya que como se ha visto puede tener efectos negativos sobre la proliferación celular.

De forma reciente se ha estudiado que las células MSC, pueden sobrevivir durante un largo tiempo como trasplantes alogénicos, esto debido a que estas células presentarían una baja inmunogenicidad, que estaría dada principalmente por la capacidad de estas células de expresar IDO (Ryan, 2005). Se propone el uso de este vector en terapia celular, sobre todo en los tipos celulares en los cuales MSC no es capaz de diferenciarse. De esta forma se direcciona la terapia hacia el tejido que lo

necesita, ya que los vectores adenovirales cuando son inyectados en el huésped transducen de forma indiscriminada, distintos tipos celulares.

Hasta la fecha, se han utilizado vectores de transferencia génica llevando el gen IDO para transducir keratinocitos (Li, 2004a) y fibroblastos (Li, 2004a), los cuales *in vitro* han determinado que inducen apoptosis en linfocitos T y B.

Es importante destacar que en este trabajo, es la primera vez que un vector adenoviral con el gen IDO es utilizado para transducir hepatocitos *in vivo*, ya que se han tratado otros tejidos con vectores similares (pulmón de rata (Swanson, 2003) e islotes pancreáticos (Yunjuan, 2004a), los cuales como trasplantes alogénicos han logrado suprimir la activación de células inmunes evitando su rechazo.

CONCLUSIONES

El vector adenoviral AdIDO, transdujo dos tipos de células humanas, A549 y MSC, expresando tanto el transgen GFP como el transgen IDO, el cual determinó una disminución en la concentración de triptófano en los medios de cultivo. De igual manera el vector transdujo hepatocitos murinos *in vivo*, y la pérdida del transgen reportero GFP, al parecer fue debido la respuesta inmune del huésped hacia el vector.

BIBLIOGRAFIA

Abbas, A. & Lichtman, A. 2001. Functions and disorders of the immune System. Saunders Company.

Alexander, A. y col, 2002. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in transplanted nodules prolongs graft survival after adoptive transfer of diabetogenic splenocytes. *Diabetes*. 51: 356-365.

Bals, R. y col, 1998. Function of the host defense system of the human airway as endpoint for gene therapy of cystic fibrosis. *Am. Soc. Gene Ther. Abs* 262.

Bird, J.J. y col, 1998. Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity*. 9:229-237.

Bloxam, D. & Warren, W. 1991. Error in the determination of tryptophan by the method of Denkla and Dewey. A revised procedure. *Anal Biochem*. 60(2):621-5.

Blomberg, P. & Smith, CE. 2003. Gene therapy of monogenic and cardiovascular disorders. *Expert Opin Biol Ther*. 3(6): 941-9.

Braun, D. y col, 2005. A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. *Blood* 106(7) :2375-2381.

Chan, S. y col, 1999. Tissue-specific consequences of the anti-adenoviral immune response: implications for cardiac transplants. *Nat. Med* 10: 1143-1149.

Chen, S. y col, 2000. *In vivo* Selection of hepatocytes Transduced with Adeno-Associated Viral Vectors. *Mol. Ther.* Vol. 1: 414-422.

Chimule, N. y col, 1998. Fas-FasL interactions play a critical role in adenoviral vector induced CTL activity in the liver. *Am. Soc. Gene Ther. Abs* 419.

Christ, M. y col, 1997. Gene Therapy with recombinant adenovirus vectors: evaluation of the host immune response. *Immunol. Lett* 57: 19-25.

Conget, P.A. & Minguell, J.J. 1999. Adenoviral-mediated gene transfer into ex vivo expanded human bone mesenchymal progenitor cells. *Exp. Hem.* 29:352-358.

Dai, W. & Gupta, S. 1990. Molecular cloning, sequencing and expression of human interferon- γ -inducible indoleamine 2,3-dioxygenase cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168:1-8.

Dai, Y. y col, 1995. Cellular and humoral immune responses to adenoviral vectors containing factor IX gene: tolerization of factor IX and vector antigens allows for long term expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1401-1405.

Davidson, B. & Allen, D. 1993. A model system for *in vivo* gene transfer into the central nervous system using an adenoviral vector. *Nature Genetics* 3, 219 – 223.

de Martin, R. 1997. Adenovirus – mediated expression of green fluorescent protein. *Gene Ther.* 5: 493-495.

Deng, S. y col, 1998. Transient Lymphocyte depletion permits long-term graft survival and transgene expression in adenoviral transfected pancreatic islets. *Am. Soc. Gene Ther. Abs* 170.

Engelhardt, J.F. y col, 1994. Ablation of E2a in recombinant adenovirus improves transgene per-sistence and decreases inflammatory responses in liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6196-6200.

Fleckner, J. Y col, 1988. Differential regulation of the human, interferon inducible tryptophanyl-tRNA Synthetase by various cytokines in cell lines. *Cytokine.* 7:70-77.

Fujigaki, S. 2000 Lipopolysaccharide induction of indoleamine 2,3 dioxigenase is mediated dominantly by an IFN-g independent mechanism. *Eur J Immunol* ; 31:2313-2318.

Funeshima, N. y col, 2005. Inhibition of allogeneic T-cell responses by dendritic cells expressing transduced indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Gene Med.* 2005 (5):565-75.

Gao, G. y col, 1996. Biology of Adenovirus vectors with E1 and E4 Deletions for Liver-Directed Gene Therapy. *J. Virol.* 8934-8943.

Grant, R. & Kapoor, V. 2003. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in IFN-gamma stimulated astrogloma cells decreases intracellular NAD levels. *Biochem. Pharmacol.* 66(6): 1033-1036.

Grohmann, U. & Fallarino, F. 2003. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol.* Vol. 24 No 5: 242-248.

Gupta, S. y col 1994. Antiparasitic and antiproliferative effects of indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme expression in human fibroblasts. *Infect. Immun.* 62: 2277-2284.

Frumento, G. y col, 2002. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T- and natural killer-cell proliferation induced by indoleamine 2,3 dioxygenase. *J. Exp. Med.* 196, 459-468.

Habara-Ohkubo, A. y col, 1991. Cloning and expression of a cDNA encoding mouse indoleamine 2,3-dioxygenase. *Gene.* 15;105(2):221-7.

Hassanain, H.H. y col, 1993. Differential regulation of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression by interferon-gamma and -alpha. Analysis of the regulatory region of the gene and identification of an interferon-gamma-inducible DNA-binding factor. *J. Biol. Chem.* 268(7): 5077-5084.

Harvey, B.G. y col, 1998. Host responses to intradermal administration of a first generation replication deficient adenovirus vector to normal individuals. Am. Soc. Gene Ther. Abs 167.

He, T. y col, 1998. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 95 2509-2514.

Ilan, Y. y col, 1997. Oral tolerization to adenoviral antigens permits long-term gene expression using recombinant adenoviral vectors. J. Clin. Invest. 99:1098-1106.

Joos, K. 1998. Blunting of immune responses to adenoviral vectors in mouse liver and lung with CTLA 4lg. Gene Ther. 5: 309-319.

Kai, S. y col, 2003. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase suppresses NK cell activity and accelerates tumor growth. J Exp. Ther. Oncol. 6: 336-345.

Kochanek, S y col, 1996. A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase. Proc Natl Acad Sci U S A. 11;93(12):5731-6.

Li, L. y col 1999. CD3 and CD28-dependent induction of PDE7 requires for T cell activation. Science 283: 848-851.

Li, Y. 2004a Cell surface of MHC class I antigen is suppressed in indoleamine 2,3-dioxygenase genetically modified keratinocytes: implications in allogeneic skin substitute engraftment. Int. immunol 16(10): 1391-1401.

Li, Y. y col, 2004b. Expression of indoleamine 2,3- dioxygenase in dermal fibroblast functions as a local immunosuppressive factor. J. Invest. Derm 122: 953-964.

Liu, H.y col, 2005. Novel Action of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Attenuating Acute Lung Allograft Injury. Am J Respir Crit Care Med.

Mackler, A.M. & Barber, E.M. 2003. Indoleamine 2,3-dioxygenase is regulated by IFN-gamma in the mouse placenta during *Listeria monocytogenes* infection. J. Immunol. 170(2): 823-830.

Malina, H.Z. & Martin, X.D. 1996. Indoleamine 2,3-dioxygenase: antioxidante enzyme in the human eye. Graefe' s Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 234457-462.

Mastrangeli, A. & Danel, C. 1993. Diversity of Airway Epithelial Cell Targets for *in Vivo* recombinant Adenovirus-mediated Gene Transfer. J. Clinical Invest. vol 91 225-234.

Meisel, R. y col, 2004. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. Blood. 15; 103(12):4619-21.

Mellor, A. y col, 2002. Cells Expressing Indoleamine 2,3-Dioxygenase Inhibit T Cell Responses. *J. Immunol* 3771-3776, 2002.

Mellor, A. y col, 2003. Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. *J. Immunol.* 171(4):1652-1655.

Mesler, L. y col, 1998. Lessons of the immune response in clinical gene therapy trials (1998) *Am. Soc. Gene Therapy Abs* 418.

Michou, A. 1997. Adenovirus-mediated transfer: influence of transgen, mouse strain and Type of immune response on persistence of transgene expression. *Gene Ther.* 4: 473-482.

Moffett, J.R. & Namboodiri, M.A. 2003. Tryptophan and the immune response. *Immunol. Cell. Biol.* 81(4): 247-265.

Munn, D. y col, 1996. Selective activation-induced apoptosis of peripheral T cells imposed by macrophages: a potential mechanism of antigen-specific peripheral lymphocyte deletion. *J. Immunol.* 156: 523-532.

Munn, D. y col, 1998. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281: 1191-1193.

Munn, D. y col, 1999. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J. Exp. Med.* 189:1363-1372.

Munn, D. y col, 2004. Ligation of B7-1/B7-2 Human CD4+ t cells triggers indoleamine 2,3- dioxygenase activity in dendritic cells. *J. immunol* 172:4100-4110.

Palomo, I. y col, 2002. *Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica.* Talca: Universidad de Talca.

Popma, S. y col, 2000. Immune Monitoring in Xenotransplantation: The Multiparameter Flow Cytometric Mixed Lymphocyte Culture Assay. *Cytometry* 42:277-283.

Ryan, M y col, 2005. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *Inflamm. Lond;* 2: 8.

Sarkhosh, K y col, 2003. Immune cell proliferation is suppressed by the interferon-gamma-induced indoleamine 2,3-dioxygenase expression of fibroblasts populated in collagen gel (FPCG). *J. Cell. Biochem* 90(1): 206-217.

Sarkhosh, K. y col. 2003a. Proliferation of peripheral blood mononuclear cells is suppressed by the indoleamine 2,3-dioxygenase expression of interferon-gamma-treated skin cells in a co-culture system. *Wound Repair Regen* 11(5): 337-345.

Sarkhosh, K. y col. 2003b. Immune cell proliferation is suppressed by the interferon-gamma-induced indoleamine 2,3-dioxygenase expression of fibroblasts populated in collagen gel (FPCG). *J. Cell Biochem.* 90(1) : 206-17.

Schroecksadel, K. y col, 2003. Increased degradation of tryptophan in blood of patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 30(9): 1935-1939.

Singh, B. y col, 1976. Virucidal effect of certain chemical contraceptives on Type 2 herpesvirus. *Am J Obstet Gynecol.* 15;126(4):422-5.

Swanson, K.A. y col, 2003. CD11c+ Cells Modulate Pulmonary Immune Responses by Production of Indoleamine 2,3-dioxygenase. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 4: 325-332.

Tan, P. y col, 2055. Modulation of human dendritic-cell function following transduction with viral vectors: implications for gene therapy. *Blood.* 15;105(10):3824-32.

Taylor, M. & Feng, G. 1991. Relationship between interferon- γ , indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J.* 5:2516-2522.

Tibbetts, C. y col, 1986. Autoregulation of adenovirus E1A gene expression. *J Virol.* 57(3):1055-64.

Terness, P. y col, 2002. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3 dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J. Exp. Med.* 196, 447-457.

Tone, S. y col, 1989. Primary structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase deduced from the nucleotide sequence of its cDNA. *Nucleic Ac. Res.* 18:367.

Uyttenhove, C. y col, 2003. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat. Med.* 9(10): 1269-1274.

van der Eb, M. y col, 1998. Severe hepatic dysfunction after adenovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene and ganciclovir administration. *Gen. Ther* 5: 451-458.

Von Bubnoff, D. & Koch, S. 2003. New jobs for an old enzyme: the revival of IDO. *Trends Immunol.* 24 (6): 295-296.

Wang, Q. & Greenurg, D. 1997. Persistent transgene in mouse liver following *in vivo* transfer with $\Delta E1/\Delta E4$ adenovirus vector. *Gene Ther.* 4:393-400.

Weiner, H. 1994. Oral Tolerance. *Proc. Natl. Acad Sci. USA.* 91:10762-10765.

Wilkinson, G. & Akrigg, A. 1992. Constitutive and enhanced expression from the CMV major IE promoter in a defective adenovirus vector. *Nucleic Acids Res.* 20(9):2233-9.

- Wilson, J. 1996. Adenoviruses as gene-delivery vehicles. *N. Engl. J. Med.* 334: 1185-1187.
- Wirleitner, B. y col, 2003. Interferon-gamma- induced conversion of tryptophan: immunologic and neuropsychiatric aspects. *Curr. Med.Chem* 10(16): 1581-1591.
- Woods, G. & Young, A. 1988. Use of A549 cells in a clinical virology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 26(5): 1026-1028.
- Yang, Y. y col, 1994a. MHC class I restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1 deleted recombinant adenoviruses. *Immunity* 18(5):433-442.
- Yang, Y. & Nunes, F. 1994b. Inactivation of E2a in recombinant adenoviruses improves the prospect for gene therapy in cystic fibrosis. *Nature Genetics* 7, 362 – 369.
- Yang, Y y col, 1994c. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 4407-4411.
- Yang, Y. & Wilson, J. 1995a. Clearance of adenovirus-infected hepatocytes by MHC class I-Restricted CD4+ CTLs *in vivo*. *J. Immunol.* 155: 2564-2570.
- Yang, Y. & col, 1995b. Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. *J. Virol.* 69: 2004-2015.
- Yoshida, R. y col, 1980. Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in small intestine and the epididymis of mice. *Arch. Biochem. Biophys.* 203: 343-351.
- Yuan, W. y col, 1998. Modulation of cellular tryptophan metabolism in human fibroblasts by transforming growth factor-beta: selective inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA synthetase gene expression. *J. Cell. Physiol.* 177: 174-186.
- Zhang, H.G. y col, 1998. Induction of specific T-cell tolerance by adenovirus-transfected. Fas ligand-producing antigen presenting cells. *Nat. Biotech.* 16:1045-1049.
- Zhang, W.W. 1999. Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther.* 6 : 113-138.
- Zhou, M. & Mellor, A.L. 1998. Expanded cohorts of maternal CD8+ T-cells specific for paternal MHC class I accumulate during pregnancy. *J Reprod Immunol.* 1998; 40(1):47-62.