



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN *IN VITRO* DE LA ENZIMA  
INDOLAMINA 2,3-DIOXIGENASA EN CÉLULAS DENDRÍTICAS  
DIFERENCIADAS A PARTIR DE MÉDULA ÓSEA Y LA MODULACIÓN DE SU  
INMUNOFENOTIPO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

RODRIGO JOSÉ JIMÉNEZ SANDOVAL



DIRECTOR DE TESIS:  
M. EN C. MIGUEL ÁNGEL HERRERA ENRÍQUEZ  
2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## ÍNDICE

❖	AGRADECIMIENTOS PERSONALES .....	1
❖	AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS .....	2
❖	ABREVIATURAS .....	3
❖	RESUMEN .....	4
❖	INTRODUCCIÓN .....	5
➤	Generalidades del sistema inmune .....	5
➤	Células del sistema inmune .....	5
➤	Células dendríticas .....	8
▪	<i>Progenitores y tipos de células dendríticas</i> .....	8
▪	<i>Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF)</i> .....	9
▪	<i>Ciclo de vida de las células dendríticas</i> .....	10
▪	<i>Presentación del antígeno</i> .....	12
➤	Tolerancia inmunológica .....	16
▪	<i>Células T reguladoras</i> .....	17
▪	<i>Células dendríticas tolerogénicas</i> .....	19
➤	Indolamina 2,3-dioxigenasa .....	21
▪	<i>Generalidades</i> .....	21
▪	<i>Implicaciones metabólicas</i> .....	21
▪	<i>Inductores de la expresión de la enzimaIDO</i> .....	22
▪	<i>IDO y células dendríticas</i> .....	23
▪	<i>Cáncer eIDO</i> .....	25
▪	<i>Utilización deIDO en inmunoterapia</i> .....	27
➤	Antecedentes .....	28
❖	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	29
❖	JUSTIFICACIÓN .....	29
❖	HIPÓTESIS .....	29
❖	OBJETIVOS .....	29
➤	Objetivo general .....	29
➤	Objetivos particulares .....	29
❖	MATERIAL Y MÉTODO .....	30
➤	Diferenciación de células dendríticas a partir de células de médula ósea .....	30
➤	Procesamiento de células dendríticas para microscopía fotónica y electrónica .....	30
▪	<i>Tinción de Giemsa</i> .....	30
▪	<i>Inmunocitoquímica para moléculas de clase II del MHC</i> .....	30
▪	<i>Microscopía electrónica de barrido</i> .....	31
➤	Estimulación de la expresión deIDO en células dendríticas .....	31
➤	Evaluación del inmunofenotipo de células dendríticas .....	31
❖	RESULTADOS .....	32
➤	Diferenciación de células dendríticas a partir de células de médula ósea .....	32
➤	Evaluación de la expresión deIDO en células dendríticas .....	34
➤	Evaluación del inmunofenotipo de células dendríticas .....	37
❖	DISCUSIÓN .....	42
❖	CONCLUSIONES .....	45
❖	PERSPECTIVA .....	45
❖	LITERATURA CITADA .....	46

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Para poder llevar a cabo este trabajo de tesis, tuve la oportunidad de recibir la ayuda de muchas personas importantes en mi vida. Sería imposible poder escribir todos los nombres de aquellas personas que aportaron, por lo menos, un pequeño grano de arena, sin embargo las personas mencionadas en los párrafos siguientes aportaron más que eso.

En primer lugar quiero agradecer a Andrés Castell y a Miguel Herrera por darme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo en el H. Laboratorio de inmunoterapia experimental de la Facultad de Medicina, UNAM. Quiero agradecer también a mis compañeras y compañeros de laboratorio que aportaron muchísimo en este trabajo con sus buenas vibras, risas y comidas: Gaby, Marlene, Pau, Jess, Katy, Bety, Daniel, Paty, Rodrigo 2.

A mis compañeros de la facultad por su compañía, amistad y cariño. Especialmente a la H. Banda Pesada.

A mis padres, por su apoyo y respeto a todas mis decisiones. A mi hermana, y a mi cuñado por su apoyo y a mi sobrina. ¡Los quiero!

A los ratones Balb/c, sin su existencia nada hubiera sido posible.

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Quiero agradecer al M. en C. Miguel Ángel Herrera Enríquez por su excelente dirección en este trabajo de tesis. También quiero agradecer al Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez por sus asesorías teóricas y prácticas.

Este trabajo no hubiera podido haberse realizado sin la asesoría teórica y técnica de:

M. en C. Gabriela Piñón Zárate  
Biól. Beatriz Hernández Téllez  
M. en C. Jessica Miriam Medrano Hernández  
Biól. Marlene Zempoaltecatl Jiménez  
M. en C. Katya Jarquín Yáñez  
Biól. Paulina Villena López  
P. de Biól. Daniel Santillán Cortés

La tesis fue llevada a cabo gracias al apoyo de los proyectos: CONACyT 50396-M, DGAPA PAPIIT IN213510 e IN214109-3.

## ABREVIATURAS

APC- alofocianina

CCR- receptor de quimiocina tipo CC

CD- célula dendrítica

CDt- célula dendrítica tolerogénica

Treg- célula T reguladora

CPA- célula presentadora de antígenos

Cy5- cianina 5

DMEM- medio Eagle modificado de *Dulbecco*

FITC- isotiocianato de fluoresceína

FSC- dispersión frontal (de luz)

GM-CSF- factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos

IDO- indolamina 2,3-dioxigenasa

IFN- $\gamma$ - interferón  $\gamma$  ó interferón tipo II

IL-interleucina

LPS- lipopolisacárido

MHC- complejo principal de histocompatibilidad

NF- $\kappa$ B- factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B

PE- ficoeritrina

SSC- dispersión lateral (de luz)

W- triptófano (trp)

## RESUMEN

Las células dendríticas (CD) son consideradas como las células presentadoras de antígenos más eficientes. Éstas se originan de células progenitoras localizadas en la médula ósea, las cuales dan lugar a precursores circulantes que posteriormente se localizan en los tejidos, donde residen como CD inmaduras con gran capacidad endocítica, y realizan una función de inmunovigilancia. Cuando ciertos antígenos u otras señales de daño tisular se unen a los receptores de las CD se desencadena un proceso de maduración/activación, que implica no sólo el procesamiento del antígeno capturado, sino también un cambio en el fenotipo que incluye un incremento en la expresión de las moléculas necesarias para la presentación antigénica, la adhesión intercelular, incremento en la expresión de receptores de citocinas, entre otros. Al mismo tiempo, las CD migran hacia los órganos linfoides secundarios donde presentan los antígenos a los linfocitos T correspondientes. Dependiendo del inmunofenotipo de las CD será el destino de la respuesta inmunológica que se origine, es decir tolerogénica ó inmunogénica si predominan las señales coinhibidoras o coestimuladoras, respectivamente.

Cuando las señales coinhibidoras predominan, se genera tolerancia inmunológica (proceso en el que se reconoce un antígeno pero no se induce una respuesta en su contra). Una molécula involucrada en los procesos de tolerancia es la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO). Ésta es una enzima que cataliza la primera reacción del metabolismo del triptófano (W), lo que origina catabolitos como la quinurenina. La expresión de IDO es fuertemente inducida por IFN- $\gamma$ . Cuando IDO es expresada en CD, éstas produce un ambiente empobrecido en W en la interfase CD/células T y enriquecido en quinurenina, lo que a su vez induce detención en la fase G1 del ciclo celular de las células T, apoptosis, anergia clonal y generación de células T reguladoras.

Así, con el objetivo de relacionar la expresión de la enzima con cambios en el inmunofenotipo de las CD, en este trabajo se analizó la expresión de diferentes moléculas indicadoras de diferenciación (CD8 $\alpha$ , CD11c), maduración (CCR7, MHCII), coestimulación (CD40, CD80, CD86) y tolerancia (CD273, CD274, IL-10) en CD en cultivo, cuando éstas expresan IDO a altas (IDO<sup>high</sup>) y bajas (IDO<sup>dim</sup>) concentraciones y se comparó con una población IDO negativa (IDO<sup>neg</sup>). Se observó que la población IDO<sup>neg</sup> presenta un fenotipo inmaduro, la población IDO<sup>dim</sup> presenta cierta modificación en su inmunofenotipo pero no lo suficiente para tener una función tolerogénica; sin embargo, la población IDO<sup>high</sup> presenta un fenotipo inmaduro con características de CD tolerogénicas con potencial para ser usadas en la inmunoterapia. Con estos resultados se concluye que IDO a altas concentraciones tiene una relación directa con la expresión de un fenotipo tolerogénico en CD *in vitro*.

## INTRODUCCIÓN

### **Generalidades del sistema inmune**

La inmunología es la rama de las ciencias biológicas encargada de estudiar la actividad de los distintos elementos del sistema inmunitario y la manera en que éstos se relacionan a nivel humoral, celular y tisular para reconocer lo propio de lo extraño y brindar una respuesta a ésta condición, la cual puede ser inmunogénica ó tolerogénica.

El sistema inmune de los animales vertebrados está compuesto por dos ramas: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (Zimmerman et al, 2010). La inmunidad innata es la primera línea de defensa del hospedero en contra de patógenos y es mediada por citocinas y proteínas plasmáticas como las del sistema de complemento, células como neutrófilos, macrófagos, linfocitos, células asesinas naturales (NK), entre otros. La respuesta inmune innata no es completamente inespecífica, como se creía originalmente, ya que es capaz de discriminar entre lo propio y una gran variedad de patógenos. El sistema inmune innato reconoce microorganismos a través de un número limitado de receptores de reconocimiento de patógenos (PRR), en contraste al gran repertorio usado por el sistema adaptativo. Los PRR reconocen elementos microbiales conocidos como patrones moleculares asociados a patógeno (PAMP) que son esenciales para la supervivencia del microorganismo y por lo tanto difíciles de modificar por dicho microorganismo (Akira et al, 2006). En términos generales, cuando son reconocidos éstos patrones moleculares, las células de la respuesta innata se activan y producen un patrón de citocinas que recluta y activa a los neutrófilos y macrófagos, al mismo tiempo que se activan mecanismos de daño contra los microorganismos como el sistema de complemento.

La inmunidad adaptativa es una respuesta inmune específica ya que los distintos tipos de linfocitos presentan en su membrana celular receptores (TCR o BCR) pertenecientes a la familia de las inmunoglobulinas que, en cada clona celular, el gen que codifica para el dominio con el que el receptor reconoce a su ligando (antígeno) sufre un rearrreglo genético. Como consecuencia de éstos rearrreglos, se producen receptores con diferentes conformaciones lo cual permite que cada clona de linfocitos cuente con un receptor único y específico a un antígeno particular, produciéndose así una alta diversidad en el sistema adaptativo capaz de responder a una gran variedad de patógenos (Akira et al, 2006; Murphy et al, 2008). Éste tipo de inmunidad es desarrollada, no sólo durante la generación y maduración del sistema inmunológico en la médula ósea y el timo, sino también a lo largo de la vida de un individuo como una adaptación a la infección de un patógeno. En muchas ocasiones, una respuesta inmune adaptativa puede resultar en un fenómeno denominado memoria inmunológica, el cual confiere inmunidad protectora de larga duración a la reinfección por un mismo patógeno (Murphy et al, 2008).

### ***Células del sistema inmune***

Tanto la inmunidad innata como la inmunidad adaptativa dependen de la eficiente actividad de las células blancas o leucocitos. Estas células se originan en la médula ósea, y muchas de



ellas se desarrollan y maduran en ella. Todos los elementos celulares de la sangre, incluyendo las células rojas, las plaquetas y las células blancas del sistema inmune (linaje mieloide y linfoide) derivan de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea (Murphy et al, 2008).

El linaje mieloide se origina a partir del progenitor mieloide común que es el precursor de macrófagos, granulocitos, células cebadas y células dendríticas (CD), pero también da origen a los megacariocitos y eritrocitos. Los macrófagos son residentes de casi todos los tejidos y son la forma madura de los monocitos, los cuales circulan en la sangre y continuamente migran a los tejidos donde completan el proceso de diferenciación. Los monocitos/macrófagos junto con los granulocitos y las CD constituyen las células fagocíticas del sistema inmune. La función de los macrófagos es engullir y degradar a microorganismos invasores, detritos celulares, restos tisulares, etc; también ayudan a inducir inflamación y reclutar células para producir una respuesta inmune por medio de la secreción de citocinas. Los granulocitos (también llamados leucocitos polimorfonucleares) se componen de tres tipos celulares: Neutrófilos- que endocitan una gran variedad de microorganismos y los destruyen eficientemente en vesículas intracelulares que contienen enzimas degradantes (conocidas como fagosomas) y otras sustancias microbicidas guardadas en los gránulos citoplásmicos; Eosinófilos y Basófilos- contienen gránulos con una gran variedad de enzimas y proteínas tóxicas que son liberadas cuando las células se activan y son importantes en la defensa en contra de parásitos. Las células cebadas o mastocitos se diferencian en los tejidos; estas células son bien conocidas por su papel de orquestar respuestas alérgicas, pero también actúan protegiendo las superficies internas del cuerpo en contra de patógenos y están involucrados en respuestas en contra de gusanos parásitos. Por último, pero no menos importante, las CD tienen procesos citoplasmáticos largos y ramificados, tienen la función de procesar y presentar antígenos (Murphy et al, 2008).

Por otra parte, el linaje linfoide se origina a partir del precursor linfoide común de la médula ósea que da origen a los linfocitos antígeno-específicos del sistema inmune y también a un tipo de linfocito que responde a la presencia de una infección pero no es específico para un antígeno, y por lo tanto es parte de la inmunidad innata. Estos linfocitos son las células NK que son capaces de reconocer y destruir a células anormales de acuerdo a la presencia o ausencia de las moléculas de clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC I). Los linfocitos antígeno-específicos (de ahora en adelante llamados únicamente linfocitos) son células capaces de montar una respuesta inmune en contra de una gran variedad de patógenos diferentes a los que una persona está expuesta. Lo anterior lo hacen posible a través de los receptores de antígenos en su superficie, mediante los cuales reconocen y se unen a los antígenos. Los linfocitos que aún no han sido activados por un antígeno son llamados linfocitos *naïve*, los que ya han encontrado un antígeno se denominan linfocitos efectoras. Existen dos tipos de linfocitos: los linfocitos B (células B) y los linfocitos T (células T). Los linfocitos B presentan en su superficie el receptor de célula B (BCR), al cual se une el antígeno, dicha unión induce proliferación y diferenciación en células plasmáticas (forma efectora de las células B). Las células plasmáticas producen anticuerpos que tienen una especificidad antigénica idéntica, pero con distintos resultados biológicos de acuerdo al tipo de anticuerpo que se produzca (IgA, IgD, IgE, IgG ó IgM). Por otra parte, las células T presentan en su superficie el receptor de célula T (TCR), al cual se une el antígeno. Después de ser activadas las células T por dicha unión

prolifera y se vuelven linfocitos T efectores: Células T citotóxicas ( $CD8^+$ ), matan células infectadas por virus y otros patógenos intracelulares; Células T cooperadoras ( $CD4^+$ ), proveen señales adicionales esenciales que activan a las células B antígeno-estimuladas para que se diferencien y produzcan anticuerpos, también activan macrófagos para que se vuelvan más eficientes; Células T reguladoras ( $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ ), suprimen la actividad de los otros linfocitos y ayudan a controlar las respuestas inmunes (Murphy et al, 2008).

Los órganos linfoides están organizados en tejidos que contienen un gran número de linfocitos en un marco de células no linfoides. En estos órganos, las interacciones que los linfocitos tienen con las células no linfoides son importantes tanto para el desarrollo de los linfocitos, la iniciación de la respuesta inmune adaptativa o para el sustento de los linfocitos. Los órganos linfoides pueden ser clasificados funcionalmente como órganos linfoides primarios o centrales (timo y médula ósea), donde los linfocitos son generados, y en órganos linfoides secundarios o periféricos (ganglios linfáticos, bazo y tejido linfoide asociado a mucosa), donde las respuestas adaptativas son iniciadas y donde los linfocitos son mantenidos (Janeway et al, 2001).

Las células dedicadas a la inmunidad innata y adaptativa residen en tejidos no linfoides y en tejidos linfoides donde son mantenidas en un equilibrio homeostático. Las perturbaciones son reconocidas por CD, que son reguladores clave del sistema inmune ya que son importantes para la activación de una rama particular de la inmunidad innata, y necesarias para la iniciación de una inmunidad adaptativa de larga duración (Granucci et al, 2004).

Las CD durante distintas etapas de diferenciación pueden regular a los efectores de la inmunidad innata, tales como las células NK y las células T asesinas naturales (NKT). Esto lo llevan a cabo, directamente, mediante interacciones célula-célula ó indirectamente a través de la secreción de citocinas. Los precursores  $CD11c^-$  de CD pueden activar a las células NK a través de la liberación de  $IFN-\alpha$ , provocando un incremento en la actividad antiviral y antitumoral en éstas células. Las CD, en etapas posteriores de diferenciación, pueden regular la actividad de las células NK y la actividad de las células NKT a través de la liberación de IL-12, IL-15 e IL-18 (Banchereau et al, 2000).

La estrategia que tienen las CD para llevar a cabo estos efectos biológicos reside en su habilidad para realizar, a través del tiempo, diferentes funciones a partir del contacto con el antígeno. De esta forma, después del reconocimiento de un antígeno, las CD inmaduras llevan a cabo un proceso de maduración que da como resultado una expresión cinética estrictamente definida de citocinas y moléculas de superficie, críticas para la activación y control de la inmunidad innata y adaptativa (Granucci et al, 2004).

## **Células dendríticas**

### ***Progenitores y tipos de células dendríticas***

Las células dendríticas son una clase especial de leucocitos activamente involucradas en iniciar respuestas inmunes innatas y adaptativas en contra de patógenos invasores (Granucci et al, 2009). Las CD son las células presentadoras de antígeno más eficientes, las cuales estimulan a las células T *naïve* y coordinan las funciones de las células T a través de una combinación de señales, tales como el reconocimiento de un antígeno, la coestimulación y la adhesión (Sheng et al, 2005).

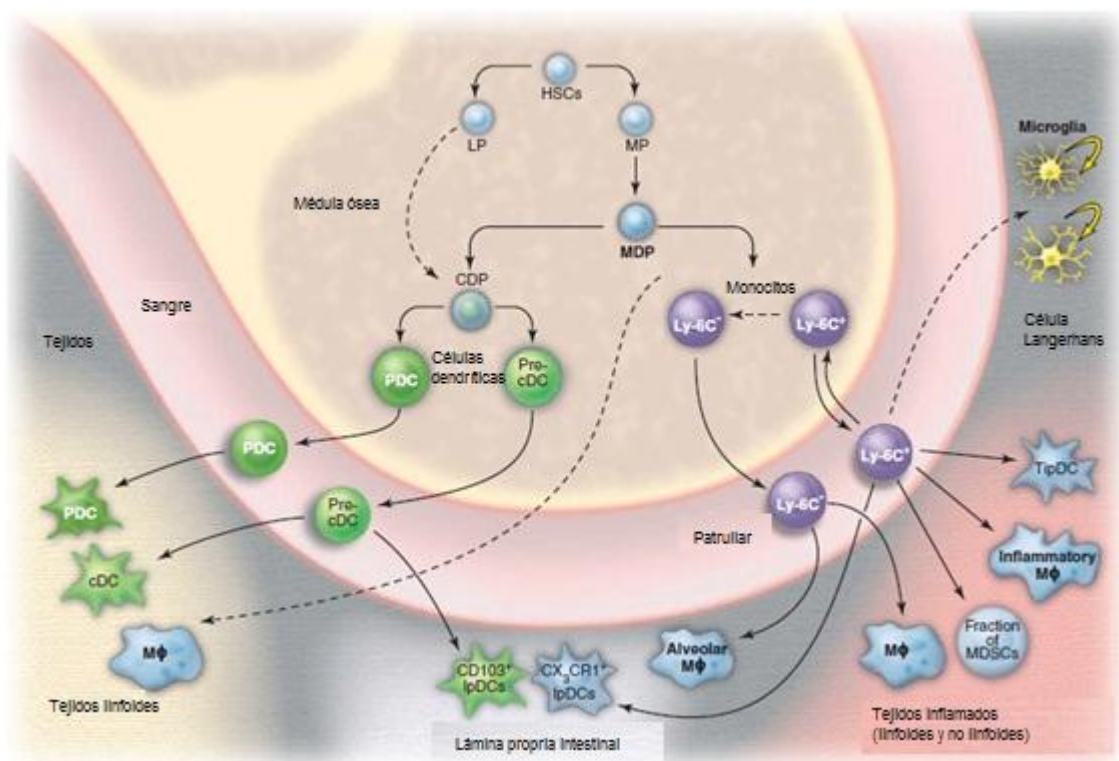
Tanto en humanos como en ratones, se ha demostrado la existencia de diferentes subtipos de CD, las cuales pueden ser clasificadas de acuerdo a su origen, estado funcional, localización y actividad, es por ello que para el presente trabajo, se decidió tomar como base la clasificación de acuerdo a su origen.

Los leucocitos tienen un origen en común en las células madre hematopoyéticas (HSC) y se desarrollan a través de diferentes vías de diferenciación en respuesta a señales internas o externas (Geissmann et al, 2010). Al proceso de diferenciación a partir de HSC se le denomina hematopoyesis (Figura 1). Las HSC pueden reconocerse por medio de la positividad al marcador de superficie celular CD34 (Banchereau et al, 2000). Éstas se encuentran en la médula ósea de los huesos largos. La médula ósea está formada por cordones celulares entre los cuales se encuentran interpuestos capilares de tipo sinusoidal. La maduración de las diferentes clases de células sanguíneas ocurre en los cordones celulares. Las células hematopoyéticas están colocadas sobre una red laxa de moléculas de matriz extracelular y células que en conjunto forman el estroma de la médula ósea (Welsch, 2008). Dentro de las células estromales se incluye a las células del endósteo, adipocitos, células reticulares, osteoblastos y fibroblastos estromales. Las células del estroma secretan una gran cantidad de citocinas que contribuyen a la maduración de las diferentes células hematopoyéticas (Quarto et al, 2002).

Las HSC dan origen a diferentes tipos de progenitores, específicamente da origen a los linajes mieloide (progenitor mieloide común) y linfoide (progenitor linfoide común), a partir de los cuales se diferencian las CD (Geissmann et al, 2010). Estos progenitores surgen a partir de eventos que subdividen y comprometen a las HSC en dos poblaciones: células madre hematopoyéticas de larga duración (LT-HSC) y células madre hematopoyéticas de corta duración (ST-HSC). Las LT-HSC contribuyen a la regeneración del linaje a largo plazo y dan origen a las ST-HSC, mientras que las ST-HSC dan origen a los progenitores multipotentes (MPP). Los MPP posteriormente dan origen a tres subpoblaciones basadas en la expresión de Flt3 (receptor de cinasa de tirosina 3 tipo FMS) y VCAM-1 (molécula de adhesión celular vascular), éstas son: Flt3<sup>lo</sup>VCAM-2<sup>+</sup>, Flt3<sup>hi</sup>VCAM-2<sup>+</sup> y Flt3<sup>hi</sup>VCAM-2<sup>-</sup>. De estas, se piensa que la subpoblación Flt3<sup>lo</sup>VCAM-2<sup>+</sup> da origen al linaje mieloide, mientras que la subpoblación Flt3<sup>hi</sup>VCAM-2<sup>-</sup> da origen al precursor linfoide común (Kondo, 2010).

A continuación se presenta un esquema en el cual se muestra la relación entre los subtipos de CD con sus progenitores (Geissmann et al, 2010). Es importante mencionar que todos estos subtipos de CD son CD11c<sup>+</sup> (Sheng et al, 2005).

- ❖ Célula madre hematopoyética (CD34<sup>+</sup>)
  - Progenitor linfoide común (LP) (Flt3<sup>lo</sup>VCAM-2<sup>+</sup>)
  - Progenitor mieloide común (MP) (Flt3<sup>hi</sup>VCAM-2<sup>-</sup>)
    - Progenitor de macrófago/CD (MDP) (lin<sup>-</sup>c-kit<sup>int</sup>Flt3<sup>+</sup>MCSFR<sup>+</sup>; Onai, 2009)
      - Monocitos
        - ◆ Macrófagos
        - ◆ CD inflamatorias (CDi). Surgen de monocitos inflamatorios
        - ◆ Células de Langerhans. Se encuentran en la epidermis. CD207<sup>+</sup>.
  - Precursor de CD común
    - ◆ CD plasmacitoides (CDp). Productoras de IFN- $\alpha$ , se encuentran en tejidos linfoides. B220<sup>+</sup>.
    - ◆ Precursor de CD clásicas o convencionales (Pre-CDc)
      - CDc (CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> y CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>). Se encuentran en tejidos linfoides.
      - CD CD103<sup>+</sup> (lamina propia).



**Figura 1.** Diferenciación de los distintos subtipos de CD (y macrófagos) a partir de la célula madre hematopoyética. Modificado de Geissmann et al, 2010.

### ***Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF)***

El factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) es una citocina que estimula la diferenciación de tres linajes de células mieloides: granulocitos, macrófagos y células dendríticas (Inaba et al, 1992). Debido a que el GM-CSF controla algunas funciones de las CD y de las células T se dice que liga a la inmunidad innata y a la adquirida (Hansen et al, 2008). Además, el GM-CSF es un factor proliferativo y de supervivencia de células

hematopoyéticas, el cual activa macrófagos maduros, eosinófilos, neutrófilos y epitelios respiratorios para que lleven a cabo funciones inflamatorias efectoras (Bozinovski et al, 2002). EL GM-CSF tiene la capacidad de incrementar las respuestas inmunes inducidas, además de alterar el balance entre las citocinas de las respuestas  $T_H1/T_H2$  (Shi et al, 2006). Esta citocina es requerida para la generación de CD *in vitro*, ya que *in vivo* se requieren otras citocinas tales como el Flt-3L (Sheng et al, 2005).

El GM-CSF es producido, *in vivo*, por diferentes poblaciones celulares. Entre estas poblaciones encontramos a los fibroblastos, células endoteliales, células T, macrófagos, células mesoteliales, células epiteliales y muchos tipos de células tumorales (Shi et al, 2006). Las poblaciones de células a las que afecta la expresión de este factor son las que pertenecen al linaje granulocitos-macrófagos y las células endoteliales, ya que presentan el receptor de GM-CSF (GMR) (Ebner et al, 2003). El GMR es expresado a bajos niveles en la superficie de éstas células hematopoyéticas, y consiste de la subunidad  $\alpha$  y la subunidad  $\beta$ c. La subunidad  $\alpha$  se une con poca afinidad a esta citocina, pero la presencia de la subunidad  $\beta$ c provoca que exista una alta afinidad entre la subunidad  $\alpha$  y el GM-CSF, causando la dimerización de ambas subunidades y la activación del receptor por medio de Jak2 que envía una cascada de señalización intracelular (los dominios de ambas subunidades y el propio GM-CSF forman una estructura dodecameral) (Hansen et al, 2008). Ésta cascada de señalización intracelular culmina con procesos de diferenciación y proliferación, entre otras funciones celulares (Sato et al, 1993).

Cuando las suspensiones de médula ósea de ratón son cultivadas en presencia de GM-CSF, tres tipos de células mieloides se expanden. a) Los neutrófilos predominan pero no se adhieren a la superficie del cultivo y carecen de productos del MHC II; b) Los macrófagos se adhieren firmemente a la caja de cultivo y expresan pobremente o no el MHC II y c) Las células dendríticas que se originan de agregados celulares que se encuentran en la superficie del cultivo. Los agregados se cubren de células parecidas a hojas y eventualmente liberan células dendríticas típicas (Inaba et al, 1992).

#### ***Ciclo de vida de las células dendríticas***

Como ya fue explicado, las CD se originan a partir de precursores localizados en la médula ósea. Los precursores de CD migran a través del torrente sanguíneo, en respuesta a quimiocinas sitio-específicas que dirigen la entrada hacia diferentes tipos de tejidos donde terminan de diferenciarse y residen, llevando a cabo su función de inmunovigilancia como CD tisulares. También, algunas subpoblaciones de CD son residentes de tejidos linfoides donde responden a estímulos inflamatorios secretando citocinas. Las CD completamente desarrolladas pueden encontrarse en las redes circulatorias del cuerpo, en las cuales se incluyen la sangre, vasos linfáticos aferentes y en órganos linfoides secundarios donde ejercen su actividad de CPA (Granucci et al, 2009).

Las CD presentan en su superficie un repertorio de receptores no clonales que utilizan para obtener información acerca de antígenos localizados en el ambiente. El fenotipo funcional adquirido por las CD depende del tipo de respuestas transcripcionales activadas en estas células, producidas por las diferentes interacciones que tengan con su microambiente. Con diferentes fenotipos funcionales se inducen diferentes respuestas inmunes. Después de la

activación con estímulos inflamatorios, las CD se vuelven particularmente eficientes en la presentación de antígenos y adquieren la habilidad para migrar a las áreas de células T en los órganos linfoides secundarios, donde presentan los antígenos a las células T *naïve* para iniciar la respuesta adaptativa primaria. Una vez que la función efectora ha sido alcanzada, las CD experimentan una diferenciación terminal y mueren por apoptosis (Granucci et al, 2009).

Para que las CD puedan capturar un antígeno necesitan de receptores que reconozcan antígenos, así como receptores para fagocitosis y/o endocitosis ó bien por pinocitosis y macropinocitosis. Los principales receptores presentes en las CD son: 1) las lectinas tipo C, en las que se incluye el receptor de manosa (CD206), DEC-205 (CD205), DC-SIGN (CD209), BDCA-2, Dectin-1, Langerina (CD207), DCIR, DCAL-1, C-LEC y DC-ASGPR/MGL-1; 2) receptores que reconocen la fracción cristalizable (Fc) de las inmunoglobulinas: FcγRI (CD32), FcγRII (CD64), FcγRIII (CD16) y el FcαR (CD89); 3) receptores para proteínas de choque térmico (HSP) como LOX-1 y CD91; 4) integrinas: CD11b, CD11c y αVβ5; 5) 5tros receptores como la molécula CD36 que se unen a células en apoptosis; 6) receptores tipo Toll (TLR): TLR1-TLR9; 7) receptores de la familia TNF (factor de necrosis tumoral): CD40, TNFα, FasL, TRANCE, LIGHT (Sheng et al, 2005).

La maduración/activación es un proceso fundamental que ocurre en el ciclo de vida de las células dendríticas. En este proceso se lleva a cabo un cambio funcional y morfológico dramático que maximiza la presentación del antígeno a las células T en respuesta a un estímulo inflamatorio (Platt, et al, 2010). Tradicionalmente, el proceso de maduración/activación se ha relacionado con los siguientes procesos:

1. Pérdida de los receptores de endocitosis/fagocitosis
2. Regulación positiva de moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 y CD86
3. Cambios morfológicos para la migración hacia órganos linfoides secundarios como pérdida de estructuras de adhesión, reorganización del citoesqueleto y adquisición de alta movilidad celular. Regulan positivamente el receptor de quimiocina tipo CC CCR7, el cual reconoce a CCL19 (MIP-3β) y a CCL21 (6Ccina). Las CD maduras dejan el tejido inflamado y entran al torrente linfoide, dirigidas por CCL21, expresado en los vasos linfáticos. Posteriormente, entran al área paracortical (zona de células T) del ganglio linfático dirigidas por las quimiocinas CCL19 y/o CCL21. Cambio en los compartimentos lisosomales con regulación negativa de CD68 y regulación positiva de la proteína de membrana asociada a lisosoma (DC-LAMP)
4. Cambios en los compartimentos del MHCII, aumenta la expresión del MHCII para la presentación antigénica a células T. (Banchereau et al, 2000)

Sin embargo, se ha demostrado que una CD fenotípicamente madura es capaz de seguir internalizando antígenos (al menos por medio de los receptores de la fracción cristalizable CD16 y CD64, y así como por DEC-205) y presentando dichos antígenos vía MHCI y MHCII, al contrario de lo que se pensaba anteriormente (Platt et al 2010). Además, investigadores como Ira Mellman indican que una CD con un fenotipo maduro no necesariamente es funcionalmente madura (referido en Stoitzner et al, 2010). Por lo tanto, el concepto de maduración en CD debe ser tomado con cautela.

Posterior a estos eventos, las CD presentan el antígeno a células T y mueren por apoptosis (Kushwah et al, 2010). La apoptosis de las CD regula la magnitud de las respuestas inmunes al

limitar la disponibilidad del antígeno a las células T. La apoptosis es regulada extrínsecamente e intrínsecamente. La vía extrínseca se lleva a cabo mediante la unión de un ligando de inducción de muerte con su receptor, lo cual resulta en la formación de un complejo de señalización de inducción de muerte, el cual corta y activa a las caspasas 8 o 10. La vía intrínseca involucra señales dentro de la célula que inducen la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la activación de caspasas para apoptosis. Los miembros antiapoptóticos de la súper familia Bcl-2 normalmente suprimen la permeabilización de la membrana mitocondrial al inhibir las proteínas proapoptóticas Bax y Bak, pero en las CD maduras estas moléculas antiapoptóticas se regulan negativamente. Los ambientes con abundante apoptosis de CD son inmuno-supresivos, promueven la generación de células Treg y muestran discapacidad funcional de las CD remanentes, lo cual indica que la apoptosis de las CD puede contribuir a la tolerancia. Después de la activación, las CD regulan genes que les permiten la inducción de una respuesta inmune máxima, y como consecuencia a ello se inicia la muerte celular. La maduración de CD a través de LPS inicia la apoptosis a través de la activación de NFAT (factor de transcripción nuclear de células T activadas) mediada por CD14. Por otra parte existen diferentes interacciones que inhiben la apoptosis de CD, por ejemplo, cuando CD40L y CD40 se unen, se induce una señalización antiapoptótica via la activación de Akt1 (cinasa de treonina/serina). Lo mismo sucede cuando CCR7 se une con sus ligandos CCL19 y CCL21 (Kushwah et al, 2010).

### ***Presentación del antígeno***

Una vez que las CD están maduras y activadas son capaces de presentar el antígeno a células T. Esto lo llevan a cabo a través del procesamiento y presentación del antígeno por tres diferentes vías: MHCI, MHCII y/o la presentación cruzada (las dos primeras representan las vías clásicas).

Las moléculas de clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHCI) son expresadas en la superficie de todas las células nucleadas del organismo y presentan fragmentos de péptidos derivados de proteínas intracelulares. Éstos péptidos generalmente derivan de las proteínas constitutivas propias de las células, pero en células infectadas por virus, los péptidos derivan de proteínas virales. El MHCI es un heterodímero compuesto por una cadena pesada y una microglobulina denominada  $\beta 2M$ . La mayoría de los péptidos presentados por el MHCI derivan de productos de traducción ribosomales defectuosos, que son degradados por el proteosoma en el citosol. Las moléculas de MHCI se pliegan y ensamblan dentro del *lumen* del retículo endoplásmico (RE) y la unión del péptido es una parte integral del proceso de ensamblaje. Como consecuencia, es necesario trasladar los péptidos por medio del Transportador Asociado con el Procesamiento Antigénico (TAP). La proteína TAP también actúa como andamio para la etapa final del ensamblaje del MHCI, *i.e.* la unión del péptido. Las chaperonas residentes del RE facilitan el plegamiento de las moléculas recién sintetizadas del MHCI, y éste se une al TAP formando un complejo junto con las chaperona calreticulina y ERP57. La tapasina une al MHCI con el TAP, y también facilita la unión de los péptidos de alta afinidad con el MHCI. Posteriormente las moléculas del MHCI se disocian del TAP, y su agrupan en los sitios de exportación en la membrana del RE, donde son reclutados selectivamente en vesículas *cargo* para ser transportadas al aparato de Golgi. Por último las moléculas del MHCI

son transportadas hacia la membrana plasmática, donde presentan el antígeno a las células T CD8<sup>+</sup> (Hewitt, 2003).

Las moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHCII) son expresadas por linfocitos B, CD y monocitos/macrófagos, y están diseñadas para unirse establemente y presentar fragmentos de proteínas exógenas al sistema inmune. El MHCII presenta el antígeno a las distintas subpoblaciones de linfocitos T cooperadores CD4<sup>+</sup> y controla la diferenciación de células B en células productoras de anticuerpos. La carga del antígeno al MHCII ocurre en la vía endocítica en un endosoma que se denomina MIIC (compartimento contenedor del MHCII). El MHCII se ensambla como un heterodímero (dos polipéptidos transmembranales) en el RE y forman un surco de unión a antígeno. El egreso eficiente del RE del MHCII es asistido por la cadena invariante (Ii). Una región de la Ii llamada CLIP (péptido Ii asociado a clase II) ocupa el surco de unión a antígeno, con lo cual se previene la unión peptídica prematura. La Ii también dirige a los complejos MHCII hacia la vía endocítica. Una vez en los compartimentos MIIC, la cadena invariante es degradada por varias proteasas endosomales, en las que se incluyen las catepsinas S y L, para preparar al MHCII para la carga del antígeno. Las proteasas degradan a la Ii paso a paso dejando al fragmento CLIP ocupando al surco de unión al antígeno. El intercambio del CLIP por los fragmentos antigénicos es facilitado por el bajo pH, el corte proteolítico del CLIP y por una chaperona única llamada HLA-DM. Ésta chaperona estabiliza al MHCII desprovisto de péptidos, previniendo la agregación y ayudando al intercambio del péptido hasta que un péptido de unión de alta afinidad es adquirido. Una vez unido al péptido, el MHCII es transportado hacia la membrana plasmática (Rocha et al, 2008).

La tercera vía de presentación antigénica llamada presentación cruzada es llevada a cabo por macrófagos y CD convencionales, se cree que las CD plasmacitoides no llevan a cabo la presentación cruzada pero la promueven en otras células ya que producen IFN tipo I (se ha sugerido que este tipo de IFN promueve la presentación cruzada). En la presentación cruzada se presentan antígenos exógenos por medio del MHCI. Los antígenos que son presentados son, principalmente, proteínas completas aunque también pueden presentarse péptidos, complejos péptido-HSP, RNA y DNA. Los mecanismos por medio de los cuales los macrófagos y las CD internalizan el antígeno son: fagocitosis (antígenos particulados) y macropinocitosis (antígenos solubles). Los antígenos internalizados entran al fagosoma y posteriormente, a través de dos vías distintas, los antígenos son cortados en péptidos y luego cargados al MHCI. La primera de estas vías consiste en transferir al antígeno del fagosoma al citosol, se cree que la proteína que lleva a cabo este proceso es la Sec61. Una vez en el citosol, el antígeno es hidrolizado en el proteosoma y posteriormente se une a una molécula TAP que lo transporta al RE, donde se une con el MHCI. Una variante de esta vía consiste en que el proceso de hidrólisis, y unión al MHCI se lleva a cabo en el fagosoma. La segunda vía no depende de TAP ni del proteosoma. Los péptidos se generan en vacuolas endocíticas, en donde son degradados por medio de la proteasa Catepsina S. Una vez degradados los antígenos, éstos se unen al MHCI, se piensa que el MHCI llega al endosoma por medio de la fusión de un fagosoma con el endosoma (Rock et al, 2005).

Para que la presentación antigénica sea exitosa es necesaria la presencia de moléculas de señalización de superficie celular (MSSC), las cuales dan origen a las señales primarias y a las señales secundarias. De acuerdo con el modelo de marea propuesto por Zhu y colaboradores



(2011), las señales primarias se definen como el iniciador de células inmunes específicas que reaccionan a estímulos extracelulares pero que no son capaces de decidir el destino de la respuesta inmune. La señal primaria depende del receptor que presente cada tipo de células. Por ejemplo, las células T  $\alpha\beta$  presentan un receptor denominado TCR  $\alpha\beta$  (receptor de células T compuesto por heterodímeros  $\alpha\beta$ , además de las moléculas accesorias CD3,  $\gamma\delta\epsilon$ , y CD247 ó cadena  $\zeta$ ) (Pérez-Flores et al, 2006) que reconoce a los pequeños péptidos antigénicos presentados en el surco del complejo mayor de histocompatibilidad en las CPA. Esta unión, o sinapsis inmunológica, representa la señal primaria para las células T, mediada por CPA como las CD. Las señales secundarias, o coseñales, son moduladores que deciden la dirección y magnitud de la respuesta inmune. Las coseñales incluyen señales con función de estimulación (o coestimulación), así como señales con función de inhibición (o coinhibición) (Zhu et al, 2011). Las señales coestimuladoras son requeridas para optimizar la respuesta inmune, ya que son señales obligatorias para la iniciación de una inmunidad efectiva y la ausencia de estas señales resulta en respuestas T abortadas y anergia de células T. Las señales coinhibitorias son señales fuertes de retroalimentación negativa, ya que tienen una importante función reguladora pues contribuyen con el mantenimiento de la tolerancia periférica, así como con la terminación de las respuestas inmunes después de la desaparición de la infección (Leitner et al, 2010; Zhu et al, 2011). Específicamente, este modelo indica que la señal primaria selecciona o marca las células, pero que no es suficiente para inducir una respuesta biológica. En la ausencia de coseñales, la señal primaria generalmente no decide la dirección o magnitud de la respuesta celular. Las coseñales, que como ya fue explicado pueden ser de coestimulación o coinhibición, son moduladores de la respuesta primaria y podrían decidir las direcciones y magnitud de las reacciones celulares. La señal primaria podría inducir una “respuesta” (activación de células T) cuando una señal coestimuladora es dominante, o activar una “no respuesta” (no activación de células T) en presencia de señales coinhibidoras dominantes. Con una señal coinhibidora fuerte, aun cuando inicialmente se tenía una “respuesta”, podría terminar en una “des-respuesta” (no activación de células T). De igual manera, una señal coestimuladora fuerte puede revertir una “no respuesta” hacia una “respuesta”. Se debe tener claro que una “respuesta” no siempre da como resultado activación del sistema inmune ya que, de acuerdo a este modelo, una “respuesta” puede ser también de inhibición o tolerancia inmunológica, e.g. activación de células Treg (Zhu et al, 2011).

Las familias de moléculas B7:CD28 (pertenecientes a la superfamilia Ig) y TNF:TNFR son un conjunto de proteínas ligando-receptor (APC-Célula T) que constituyen los principales tipos de coseñales (coestimulación y coinhibición), aunque existen otras familias de proteínas que llevan a cabo estas funciones (Crawford et al, 2009; Leitner et al, 2010). Los miembros de la familia B7:CD28 se clasifican en tres grupos de acuerdo a sus funciones:

El Grupo 1 está compuesto por B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) y B7-H2 (CD275 o L-ICOS). CD80 y CD86 se expresan únicamente en CPA y células hematopoyéticas. Cuando CD80 o CD86 interactúan con CD28 se induce la activación de células T *naïve*, producción de IL-2, supervivencia de células T ya que se regula positivamente Bcl-<sub>XL</sub> (proteína antiapoptótica), se promueve la progresión del ciclo celular, la respuesta de células T se asegura después de la activación inicial ya que esta coestimulación está asociada al metabolismo de la glucosa vía AKT; cuando la interacción ocurre entre CD80 o CD86 con el receptor inhibidor antígeno 4 de linfocito T citotóxico (CTLA-4 o CD152), se regula negativamente la activación de células T

dependientes de CD28, también se inhibe la progresión del ciclo celular y la producción de IL-2. La molécula L-ICOS (células B, macrófagos y tejidos no linfoides) se une a ICOS, que se encuentra en células T y B, se requiere para la activación de células T CD4<sup>+</sup> y la polarización de células T hacia células efectoras T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 y T<sub>H</sub>17 (Seliger et al, 2008; Crawford et al, 2009; Leitner et al, 2010).

El Grupo 2 compuesto por B7-H1 (ligando de muerte celular programada PD-L1 o CD274) y B7-DC (PD-L2 o CD273) son los ligandos del receptor de muerte celular programada 1 (PD-1 o CD279) (Seliger, et al, 2008). La unión del PD-1 con sus ligandos resulta en una señalización negativa, ya que da como resultado una regulación a la baja de la actividad de los linfocitos T, la inhibición en proliferación y producción de citocinas, como interleucina 2 (IL-2), previenen la transcripción del gen que codifica para CD28. También previene la activación excesiva de las células T y está relacionada con las células Treg. Se sugiere que el PD-1 está involucrado en el mantenimiento de la autotolerancia (tolerancia periférica), ya que se ha observado que cuando el PD-1 está ausente en ratones *knockout*, éstos desarrollan enfermedades autoinmunes (Nishimura et al, 2001; Leitner et al, 2010; Thangavelu et al, 2011).

Por último, el grupo 3 de esta familia está compuesto por B7-H3 (CD276) y B7-H4 (B7x o B7S1), a los cuales no se les ha identificado un receptor. La expresión de CD276 es regulada positivamente por LPS en CD. La expresión de B7-H4 está restringida a células del epitelio de riñones, pulmones y páncreas. Debido a que el receptor no ha sido identificado, es difícil definir su participación en la regulación de células T. A pesar de lo anterior, se sabe que CD276 tiene una función coestimuladora ya que estimula la proliferación de células T, la secreción de citocinas y la actividad citolítica, pero presenta también funciones inhibitoras como el deterioro de la respuesta T<sub>H</sub>1 y la lisis mediada por células NK, en cambio B7-H4 tiene actividad inhibitora ya que bloquea la producción de citocinas y la proliferación de células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> (Seliger, et al, 2008; Leitner, et al, 2010).

Las señales provenientes de las moléculas de la familia TNF:TNFR tienen funciones muy importantes, muchas de las cuales no están relacionados con funciones inmunológicas. Algunos de los pares de receptores-ligandos que están involucrados en procesos de coestimulación de células T son: 4-1BB/4-1BBL, OX40/OX40L, CD27/CD70, GITR/GITRL, CD30/CD30L, HVEM/LIGHT y CD40/CD40L (CD154). Se ha visto que OX40L, CD27, GITRL y 4-1BBL tienen una función coestimuladora ya que inducen la proliferación y producción de citocinas en células T, aunque la más potente es 4-1BBL. Se cree que HVEM además de tener una función coestimuladora cuando se une con LIGHT, tiene funciones inhibitoras cuando se une a otros ligandos como BTLA y CD160. La interacción entre CD40, en CD, y CD40L, en células T CD4<sup>+</sup> activadas, puede amplificar profundamente las respuestas T ya que esta unión resulta en la regulación positiva de moléculas MHC y otras moléculas coestimuladoras en las CD (por este efecto se dice que la función principal de esta unión es indirecta) (Leitner et al, 2010).

## Tolerancia inmunológica

El sistema inmunológico protege al hospedero de una gran variedad de microorganismos patógenos, al mismo tiempo que evita reacciones inmunes excesivas que pudieran ser perjudiciales para el hospedero. Las reacciones inmunes, protectoras y dañinas, son llevadas a cabo principalmente por linfocitos T y B, los cuales poseen una diversidad enorme en el reconocimiento antigénico, alta especificidad antigénica, actividad efectora potente y memoria inmunológica de larga duración. Debido a esta gran potencia, puede producirse un gran daño al hospedero si se activan respuestas inmunes aberrantes, como autoinmunidad o alergia (Sakaguchi et al, 2008). Para evitar esto, los mamíferos tienen la capacidad de reconocer ciertos antígenos y no rechazarlos (antígenos propios, o autoantígenos, y antígenos extraños, o aloantígenos), a este fenómeno se le denomina tolerancia inmunológica. La tolerancia es un proceso que ocurre en varias células del sistema inmune, las cuales llevan a cabo dos tipos de tolerancia: la tolerancia central, en órganos linfoides primarios, y tolerancia periférica, que ocurre en órganos linfoides secundarios (Garavito Rodríguez et al, 2002).

La tolerancia central se refiere a aquellos eventos en la vida temprana de los linfocitos que enfocan al sistema inmune adaptativo en los patógenos y lo desenfocan de los tejidos sanos. Este proceso se lleva a cabo en los sitios primarios de desarrollo de los linfocitos (la médula ósea para los linfocitos B en desarrollo y el timo para los linfocitos T en desarrollo) e involucra todos los mecanismos por los cuales el reconocimiento de autoantígenos resulte en autotolerancia. Aunque los mecanismos de tolerancia central son eficientes, no pueden eliminar a todos los linfocitos autorreactivos, en parte porque no todos los autoantígenos son expresados en los sitios primarios de desarrollo de los linfocitos. La afinidad del TCR por los ligandos MHC-autoantígeno es el parámetro crucial que dirige el resultado del desarrollo en el timo. Los progenitores que no tienen afinidad o muy poca afinidad mueren por. Se piensa que este es el destino de la mayoría de los timocitos. Si el TCR tiene poca afinidad por el complejo MHC-autoantígeno, entonces el progenitor sobrevive y se diferencia, a este proceso se le llama selección positiva. Si el progenitor tiene una alta afinidad hacia los complejos MHC-autoantígeno, entonces diferentes resultados son posibles. El progenitor autorreactivo con alta afinidad puede ser seleccionado en contra, proceso que se denomina selección negativa. El mecanismo principal de selección negativa es la supresión clonal, que es el "suicidio" de progenitores de células T que tienen alta afinidad por los autoantígenos. Otros dos mecanismos importantes de selección negativa, pero con un papel menor, son la edición del receptor (la unión del autoantígeno con el TCR durante el desarrollo produce un segundo rearrreglo genético del receptor, lo cual produce un reemplazo del receptor autorreactivo por uno benigno) y la anergia (estado de no respuesta hacia un antígeno). En células T, se cree que la selección clonal ocurre en las últimas etapas del desarrollo de estas células, específicamente durante la transición de dobles positivas hacia simples positivas. Las células que llevan a cabo la selección son las células epiteliales del timo, de la corteza o de la médula, ya que expresan moléculas coestimuladoras, antígenos específicos de tejidos periféricos (TSA) y el regulador transcripcional AIRE (regulador autoinmune); también las células dendríticas que se encuentran en la médula del timo participan en la selección clonal. Otro tipo de proceso para eliminar a las células autorreactivas de alta afinidad es la diferenciación de éstas hacia células con un fenotipo regulador, e.g. células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> (Hogquist et al, 2005).

Debido a que la tolerancia central no puede eliminar a todos los linfocitos T autorreactivos, existe otro mecanismo denominado tolerancia periférica. La tolerancia periférica es la falta de respuesta de linfocitos maduros en la periferia hacia antígenos específicos. Diferentes mecanismos controlan la autorreactividad de los linfocitos que han escapado de los mecanismos de la tolerancia central. La tolerancia periférica está asociada con la supresión en la producción de anticuerpos autorreactivos producidos por las células B y con la inhibición de células T efectoras autorreactivas, como los linfocitos T citotóxicos (Vignali et al, 2008). El primer mecanismo que actúa para llevar a cabo la tolerancia periférica, consiste en separar anatómicamente a las células T potencialmente autorreactivas de células parenquimatosas que expresan antígenos restringidos a tejidos (TRA) o autoantígenos. Debido a que los linfocitos T *naïve* se encuentran circulando entre el torrente sanguíneo y los órganos linfoides secundarios, a través de los vasos linfáticos (esto lo llevan a cabo por medio de moléculas como CCR7 y CD62L, que reconocen las paredes de las vénulas de los ganglios linfáticos) hasta que se unen con un antígeno específico, los linfocitos T no están en contacto con aquellos órganos que podrían presentar autoantígenos y activar una respuesta autoinmune. Pero, cuando una célula T se vuelve de memoria-efectora, se regulan a la baja CCR7 y CD62L, lo cual da como consecuencia que estas células circulen a través de la mayoría de los tejidos del cuerpo para, posteriormente, regresar al torrente sanguíneo, a través de la linfa de drenaje de tejidos. Este cambio en los patrones de circulación en las células T de memoria-efectoras aumenta el riesgo de que una célula T potencialmente autorreactiva tenga acceso a tejidos parenquimatosos que expresan autoantígenos. Otro mecanismo por el cual se lleva a cabo este tipo de tolerancia es mediante el desarrollo de la falta de respuesta funcional de células T. Este proceso es llevado a cabo por CD tolerogénicas (CDt) residentes de timo y ganglios linfáticos en ausencia de inflamación, ya que son capaces de inducir tolerancia en células T con un TCR de alta avidéz hacia los complejos MHC-péptido propio, las células T se vuelven anérgicas. Un último mecanismo que ayuda al mantenimiento de la tolerancia periférica es la supresión periférica de células T autorreactivas. Esta supresión ocurre después de que las células T autorreactivas se unen de manera crónica con los complejos MHC-péptido propio, ya que las éstas células mueren por apoptosis como resultado de una combinación de eventos moleculares: la unión del receptor Fas con su ligando FasL y la activación de los reguladores de la vía de muerte mitocondrial Bcl-2 y Bcl<sub>xL</sub> por medio de Bim. Cuando estos mecanismos de tolerancia periférica fallan pueden dar origen a enfermedades autoinmunes (Mueller, 2010).

### ***Células T reguladoras***

Como se ha explicado previamente, las células T presentan diferentes tipos de células CD4<sup>+</sup> efectoras, uno de estos tipos son las células T reguladoras. Este tipo de células T son esenciales para mantener la tolerancia periférica, prevenir enfermedades autoinmunes y limitar las enfermedades inflamatorias crónicas. Sin embargo, también limitan las respuestas benéficas ya que suprimen la inmunogenicidad y limitan la inmunidad antitumoral. Por lo anterior se dice que tienen un efecto benéfico y otro deletéreo (Sakaguchi et al, 2008; Vignali et al, 2008). El sistema inmune normal produce células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> que están comprometidas para suprimir respuestas inmunes en contra de antígenos propios, casi propios (como células tumorales) y extraños. El timo normal produce células T autorreactivas potencialmente patógenas, así como células Treg maduras y funcionales. La células Treg que se forman naturalmente expresan el factor de transcripción Forkhead box P3 (FOXP3), que regula el

desarrollo y función de éstas células. El FOXP3 induce la expresión de CD25 (cadena  $\alpha$  del receptor de interleucina 2), de CTLA-4 y la proteína GITR, la cual reprime la producción de IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$ . Las células Treg también pueden ser formadas en la periferia a partir de células T *naïve*. Se ha visto que en presencia de TGF- $\beta$ , IL-2 y ácido retinoico, las células T *naïve* CD4<sup>+</sup> pueden adquirir un fenotipo regulador (Sakaguchi et al, 2008).

Los mecanismos de supresión por medio de los cuales actúan los Treg se pueden agrupar en cuatro tipos:

1. Supresión por citocinas inhibitorias- la producción de IL-10, TGF- $\beta$  e IL-35 bloquea las respuestas inmunes. Se ha observado que IL-10 suprime la inmunidad antitumoral, controla las respuestas inflamatorias inducidas por patógenos o daños ambientales. Específicamente, IL-10 actúa principalmente sobre CPA y linfocitos (Vignali et al, 2008). En los linfocitos T, IL-10 suprime la producción de IL-2, IL-4, IL-5 e IFN- $\gamma$  por lo que las respuestas T<sub>H1</sub> y T<sub>H2</sub> se inhiben. En CPA se suprime la presentación de antígenos y la expresión de moléculas coestimuladoras. Estos efectos se deben a que, al unirse IL-10 con su receptor IL-10R, se inhibe el factor nuclear NF- $\kappa$ B, el cual controla la expresión de muchas de las moléculas que son inhibidas (Asadullah et al, 2003). Por otra parte, el TGF- $\beta$  controla la respuesta inmune en contra de *M. tuberculosis*, suprime respuestas alérgicas y limita la inmunidad antitumoral mediante la anergia en células T efectoras. Por último, la IL-35 se ha visto que inhibe la proliferación de células T, aún no se tienen muchos estudios acerca de esta citocina (Vignali et al, 2008).
2. Supresión por citolisis- esta actividad la llevan a cabo mediante la secreción de perforina y granzimas, específicamente la granzima A dependiente de perforina y granzima B parcialmente dependiente de perforina. También se sabe que otra forma de citolisis inducida por Treg es a través de las vías activadas por TRAIL-DR5 y galectina-1 (Vignali et al, 2008).
3. Supresión por disrupción metabólica- este tipo de mecanismo controla la disrupción metabólica de la célula T efectora objetivo. Se cree que la alta expresión de CD25 en células Treg está relacionada con el agotamiento de IL-2 en el medio, lo cual provoca apoptosis en células T efectoras, ya que requieren de IL-2 para sobrevivir, pero este hecho aún está en debate. Por otro lado, se han descrito otros mecanismos de disrupción metabólica que inducen la liberación de nucleósidos de adenosina intracelular o extracelularmente. Cuando se expresan las ectoenzimas CD39 y CD73 se genera adenosina pericelular, la cual suprime la función de las células T efectoras a través de la activación del receptor 2A de adenosina, también inhibe la expresión de IL-6 y promueve la secreción de TGF- $\beta$ , lo cual amplifica la generación de células Treg (Vignali et al, 2008).
4. Supresión mediante la modulación de la función o maduración de CD- además del efecto directo de las células Treg sobre las células T efectoras, las Treg podrían también modular la maduración y/o función de las CD. Se cree que las células Treg y las CD interactúan mediante la molécula inhibitoria CTLA-4, así mismo se cree que se induce la expresión de la enzima Indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) en las CD. Esta enzima es una molécula que presenta funciones supresoras. También se ha visto que la interacción de una Treg con una CD regula negativamente las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86. Las células Treg también expresan la proteína LAG3 (o

CD273) que se une al MHCII en las CD inmaduras lo cual induce una vía de señalización inhibitoria mediada por ITAM (motivo de activación de un inmunoreceptor basado en tirosina) que suprime la maduración de las CD y su capacidad inmunoestimuladora (Vignali et al, 2008).

### ***Células dendríticas tolerogénicas***

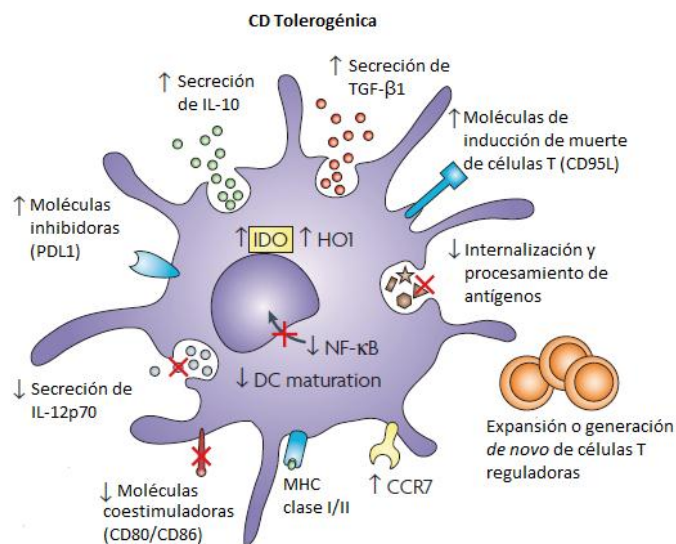
Las CD presentan muchas funciones tanto en la inmunidad innata como en la inmunidad adaptativa. Pero estas células también tienen la capacidad de generar tolerancia central y periférica. La tolerogenicidad en CD no es exclusiva de un subtipo de CD, ni está restringida al estado de inmadurez de este tipo de células. En la tolerancia central, las CD participan en la supresión clonal de células T autorreactivas. Esto se lleva a cabo en la médula del timo, que es en donde reside la mayoría de las CD del timo. Las CD del timo tienen la capacidad de capturar antígenos, procesarlos y presentarlos en un contexto del MHCI, el cual es necesario para suprimir a las células T autorreactivas (Steinman et al, 2003). En el estado basal o de equilibrio, las CD capturan proteínas solubles y cuerpos apoptóticos en ausencia de señales de maduración. Posterior a esta captura de antígenos propios, las CD migran hacia órganos linfoides secundarios donde silencian a células T y transfieren el péptido a CD tolerogénicas (CDt), este proceso es parte de la tolerancia periférica mediada por CD (Steinman et al, 2003; Rutella et al, 2006). Para poder llevar a cabo el transporte y procesamiento de los autoantígenos es necesario que las CD estén parcialmente maduras (expresión alta de MHCII, CD80, CD86 e IL-10, nula expresión de IL-12 y TNF- $\alpha$ ), esto significa que deben tomar bajas dosis de los antígenos, pero este estímulo no es lo suficientemente fuerte para que las CD se activen y produzcan citocinas proinflamatorias como IL-12, aunque se ha observado que CD totalmente maduras son capaces de producir citocinas tolerogénicas como IL-10 y expandir células Treg (Rutella et al, 2006).

Las características más notables de las CDt (Figura 2) son las siguientes (Morelli et al, 2007):

- Habilidad para adquirir y presentar antígenos a células T antígeno-específicas.
- Baja expresión constitutiva de moléculas MHC de superficie y expresión neta baja de moléculas coestimuladoras (*e.g.* CD80 y CD86) en comparación con CD274.
- Baja producción de IL-12 y alta producción de IL-10 e IDO.
- Resistencia a la maduración en respuesta a señales de peligro tales como ligandos de TLR, la unión CD40-CD40L y la proteína del grupo de caja 1 de alta movilidad (HMGB1).
- Habilidad para generar, seleccionar y/o expandir células Treg aloantígeno-específicas, naturales o adaptativas.
- Habilidad para promover apoptosis en células T efectoras.
- Habilidad para responder a células Treg por medio de la regulación positiva en la expresión moléculas inhibitoras (*e.g.* IL-10, IDO) para proveer un circuito de retroalimentación inhibitorio.
- Habilidad para migrar a las áreas de células T en órganos linfoides secundarios por medio de la expresión de receptores de quimiocina de superficie relevantes y capacidad de respuesta a sus ligandos afines.
- Longevidad *in vivo*, resistencia a la muerte mediada por células NK o células T.

Las CD pueden convertirse en tolerogénicas debido a la acción de una gran variedad de citocinas. Convencionalmente, IL-10 y TGF- $\beta$  han sido implicadas en la diferenciación de CDt *in vitro*. IL-10 interfiere con el GM-CSF ya que promueve la generación de macrófagos con una actividad endocítica amplificada pero una función pobre de presentación antigénica. La estimulación de CD con TNF- $\alpha$  junto con una posterior estimulación con tiroglobulina, induce la liberación de IL-10 en células Treg. Las CD tratadas con IFN- $\lambda$  adquieren un fenotipo semimaduro (MHCI/II alto, moléculas coestimuladoras bajas o altas y baja expresión de IL-12) e inducen la proliferación de células Treg. Se ha demostrado que cuando se administra el GM-CSF en ratones, éste expande las CD en bazo e induce un fenotipo semimaduro (MHCII y moléculas coestimuladoras altas y bajos niveles de citocinas proinflamatorias), así como la generación de células Treg y la inhibición de tiroiditis autoinmune experimental (EAT) (Gangi et al, 2005). En experimentos *in vitro* también se ha demostrado que el GM-CSF, a bajas dosis y sin ayuda de otras citocinas, produce que CD en cultivo derivadas de médula ósea tengan un fenotipo semimaduro, tengan la capacidad de producir una no respuesta en células T y exista una supervivencia prolongada *in vivo* hacia aloinjertos (Lutz et al, 2000).

Algunos mecanismos por medio de los cuales las CD inducen o mantienen la autotolerancia *in vivo* han sido explotados para generar CDt *in vitro* que, cuando son transferidas, inducen tolerancia donador-específica con propósitos terapéuticos. También se han hecho estudios en los cuales se utilizan los avances en la tecnología de transferencia genética para incrementar el potencial tolerogénico de las CD para que expresen moléculas inmunosupresivas, o para bloquear la expresión de moléculas coestimuladoras. Algunas patologías en las que se han probado este tipo de células son: enfermedad del injerto en contra del hospedero, tiroiditis autoinmune experimental, diabetes tipo I, artritis reumatoide (Morelli et al, 2007).

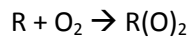


**Figura 2.** Esquema de una CDt en la cual se aprecian las moléculas que se regulan positiva o negativamente. También se muestran algunos procesos (maduración, migración, expansión de células Treg) que se modifican. Modificado de Morelli et al, 2007.

## Indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO)

### Generalidades

Las oxigenasas son enzimas que contienen metal y catalizan la incorporación de una molécula de oxígeno (O<sub>2</sub>) en un sustrato, y de esta manera juegan un papel crucial en el metabolismo y síntesis de una gran variedad de sustancias biológicas. Dos tipos de oxigenasas se conocen actualmente: las monooxigenasas y las dioxigenasas. La enzima IDO pertenece al grupo de las dioxigenasas. La forma en que actúan las dioxigenasas se representa en la siguiente forma (Sugimoto et al, 2006):



La IDO1 (de ahora en adelante denominada únicamente IDO) tiene una proteína paróloga descubierta recientemente denominada IDO2. Se dice que es paróloga ya que el gen que la codifica se encuentra adyacente al gen que codifica para IDO, lo cual sugiere que surgió a partir de duplicación de genes. Los genes *IDO1* e *IDO2* se localizan en el cromosoma 8 tanto en humanos como en ratones (Austin et al, 2010). El gen *IDO1* tiene un solo transcrito, mientras que el gen *IDO2* tiene cuatro variantes de intrones (Maiwald et al, 2010). El gen *IDO1* está compuesto por 14.28 kpb, mientras que el gen *IDO2* está compuesto por 81.44 kpb (Genbank, 2011). La proteína para la cual codifica el gen *IDO1* en ratones está compuesta de 403 aminoácidos y tiene un peso molecular de 45,324Da, mientras que la proteína para la cual codifica el gen *IDO2* está compuesta por 407 aminoácidos y tiene un peso molecular de 45,639Da. Existe un 43% de homología entre estas dos proteínas a nivel de aminoácidos (Austin et al, 2010).

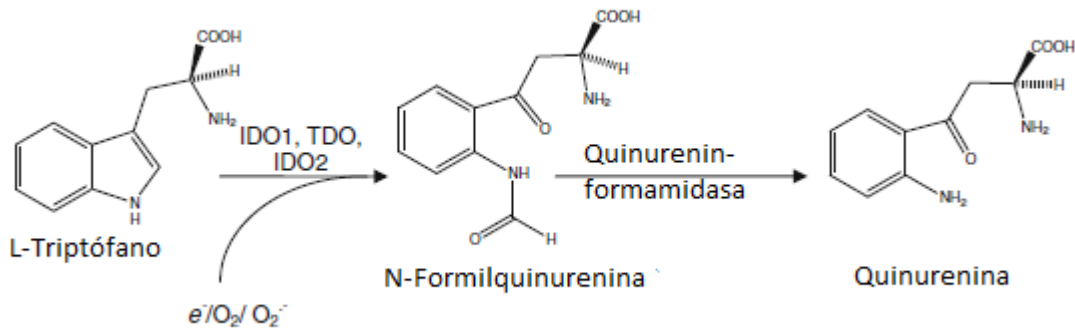
Aunque las enzimas IDO e IDO2 tienen actividades enzimáticas similares, sus patrones de expresión en tejidos son diferentes (Maiwald et al, 2010), es por ello que para este trabajo únicamente se enfocará en IDO y se incluirá a IDO2 sólo en algunos otros aspectos de la introducción. IDO es una hemoproteína que está compuesta por dos dominios: uno pequeño y otro grande. El dominio grande está compuesto completamente por aminoácidos en forma de hélices y el dominio pequeño está compuesto por hélices y hojas β. Al ser una hemoproteína presenta un grupo hemo (el sitio activo de esta enzima), el cual tiene un átomo de hierro (Fe) en el centro, al cual se une el O<sub>2</sub> (Sugimoto et al, 2010).

### Implicaciones metabólicas

El L-triptófano (W) es un aminoácido que contiene un grupo indol (anillo bencénico unido mediante los carbonos 2 y 3 a un anillo de cinco carbonos con un grupo amino) incorporado en su cadena lateral. Es el aminoácido esencial menos abundante, ya que representa únicamente el 1% del total de contenido de aminoácidos en seres humanos (Austin et al, 2010). La ruta de la quinurenina fue descrita primero como la ruta principal para el metabolismo del W en 1947 (referido en Austin et al, 2010). El primer paso de la vía de la quinurenina es el rompimiento oxidativo del enlace doble entre el carbono 2 y 3 del anillo pirrólico del grupo indol del W, a través de la incorporación de oxígeno molecular o un anión superóxido (Figura 3). El producto de este rompimiento es la N-formilquinurenina (Sugimoto et al, 2006; Austin et al, 2010). Las enzimas capaces de catalizar este paso inicial de la vía de la quinurenina son la IDO, la IDO2 y la



triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO), que se encuentra únicamente en el hígado (Sugimoto et al, 2006; Austin et al, 2010; Maiwald et al, 2010).



**Figura 3.** En este diagrama se aprecian los primeros dos pasos en el metabolismo del triptófano y la participación de IDO en el rompimiento del anillo pirrólico del W para ser convertido en N-formilquinurenina. Modificado de Austin et al, 2010.

A través de la vía de la quinurenina, el W puede servir como fuente para la producción de muchas moléculas importantes, además de su función como bloque para la construcción de proteínas. La vía de la quinurenina puede ser conceptualmente dividida en tres segmentos secuenciales y tres ramas laterales distintas. La vía catabólica completa, que ocurre en el hígado (hepatocitos), resulta en una oxidación total del W, por lo que se genera trifosfato de adenosina (ATP) y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Los tres segmentos secuenciales de la vía de la quinurenina incluyen al segmento inicial en el cual se rompe el W en quinurenina (lo llevan a cabo muchos tipos celulares), el segundo segmento es donde se convierte la quinurenina en quinolinato (lo llevan a cabo únicamente leucocitos y hepatocitos) y el último segmento secuencial incluye la actividad de las enzimas que resulta en una oxidación total (sólo en hepatocitos). Las ramas laterales son: la rama lateral de transaminación para la síntesis de ácido quinurénico, una rama lateral menor asociada con la producción de ácido picolínico o picolinato y la rama de síntesis de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>). Este último compuesto es muy importante ya que es un cofactor esencial en muchas reacciones celulares que van desde la síntesis de ATP hasta la reparación del DNA. Para la síntesis de NAD<sup>+</sup> es necesario tener como sustrato al quinolinato (segundo segmento secuencial de la vía de la quinurenina) el cual es una neurotoxina endógena, la producen astrocitos, hepatocitos y leucocitos (Moffett et al, 2003).

### **Inductores de la expresión de la enzima IDO**

Existen diferentes moléculas que inducen la expresión de IDO. Entre ellas podemos encontrar IFN tipo I y II, virus, lipopolisacáridos (LPS), ciclooxigenasa 2 (COX-2), óxido nítrico (NO), TGF-β (Katz et al, 2008) y oligonucleótidos ricos en cisteína-p-guanina (CpG-ODN), reconocidos por TLR-9, a altas concentraciones y administrados de forma sistémica (Wingender et al, 2006). El IFN-γ es uno de los más potentes inductores de IDO en células del sistema inmune como en las CPA (Scheler et al, 2007; Jürgens et al, 2009).

Los IFN se clasifican en tipo I y tipo II, de acuerdo a la especificidad del receptor y homología de secuencia. Los IFN tipo I se componen por IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\omega$  e IFN- $\tau$ , todos están relacionados estructuralmente y se unen al mismo receptor (el IFNAR, compuesto por las cadenas IFNAR1 e IFNAR2). El tipo II está compuesto únicamente por el IFN- $\gamma$ . No está relacionado estructuralmente con los IFN tipo I, se une a un receptor diferente y es codificado en un *locus* cromosomal separado. La producción de IFN- $\gamma$  es controlada por citocinas secretadas por CPA, mas notablemente por IL-12 e IL-18. Funcionalmente, el receptor de IFN- $\gamma$  (IFNGR) está compuesto por dos cadenas IFNGR1 de unión al ligando asociadas con dos cadenas IFNGR2 de transducción de señal y la maquinaria asociada de señalización. El dominio intracelular del IFNGR1 contiene motivos de unión para la cinasa de tirosina Janus (Jak)1, y el activador de transcripción y transductor de señal (Stat)1, que son la maquinaria asociada de señalización. Los motivos de unión de Jak1 y Stat1 son requeridos para la fosforilación del receptor, transducción de la señal e inducción de una respuesta biológica. La región intracelular de IFNGR2 contiene un motivo de unión no contiguo para el reclutamiento de Jak2 para la participación en la transducción de señal. El IFN- $\gamma$  señala principalmente por la vía Jak-Stat, vía utilizada por más de 50 citocinas, factores de crecimiento y hormonas para afectar la regulación genética. Después de la unión del ligando, los dominios intracelulares de las subunidades IFNGR1 e IFNGR2 se abren para permitir la asociación de los componentes de señalización de cada subunidad. La unión del ligando induce la autofosforilación de Jak2 y la activación, lo cual permite que Jak1 sea transfosforilado por Jak2. La Jak1 activada fosforila tirosinas (Y) funcionalmente críticas ubicadas en el residuo 440 de cada cadena IFNGR1 para formar dos sitios de acoplamiento adyacentes para los dominios SH2 (homología 2 src) del Stat1 latente. El par Stat1 reclutado en el receptor es fosforilado probablemente por Jak2. La fosforilación induce la disociación del homodímero de Stat1 del receptor. El homodímero disociado Stat1 entra al núcleo y se une a elementos del promotor que inician o suprimen la transcripción de genes regulados por IFN- $\gamma$ . Los homodímeros de Stat1 se unen al DNA en los elementos GAS (sitio de activación de interferón gamma) de la secuencia consenso TTCN(2-4)GAA (Schroder et al, 2004). Uno de los genes inducibles por la vía de señalización de IFN- $\gamma$  mediada por Jak-Stat es el que codifica para la proteínaIDO (Imir et al, 2002).

Las tejidos donde normalmente se expresa IDO son: pulmones, intestino, epidídimo, timo, fibroblastos (Scheler et al, 2007; Katz et al, 2008) y en células del sistema inmune tales como monocitos, macrófagos y CD (Wingender et al, 2006; Scheler et al, 2007; Maiwald et al, 2010); mientras que TDO se expresa única y constitutivamente en el hígado (Moffett et al, 2003; Maiwald et al, 2010) e IDO2 tiene una máxima expresión en los riñones (Wee et al, 2008).

### ***IDO y células dendríticas***

La expresión de IDO no es una característica constitutiva en las CD humanas en condiciones inmunológicas homeostáticas, ya que requiere de inducción (Jürgens et al, 2009). Debido a lo anterior y al hecho de que IDO no causa autoinmunidad cuando está inactivo a nivel del organismo, se implica que IDO no está involucrado en tolerancia hacia antígenos propios, sino en tolerancia hacia antígenos extraños donde la no respuesta inmune puede ser importante (e.g. antígenos fetales, antígenos ambientales en piel y mucosas ) (Prendergast, 2008), aunque el hecho de crear tolerancia hacia antígenos extraños o hacia antígenos tumorales puede

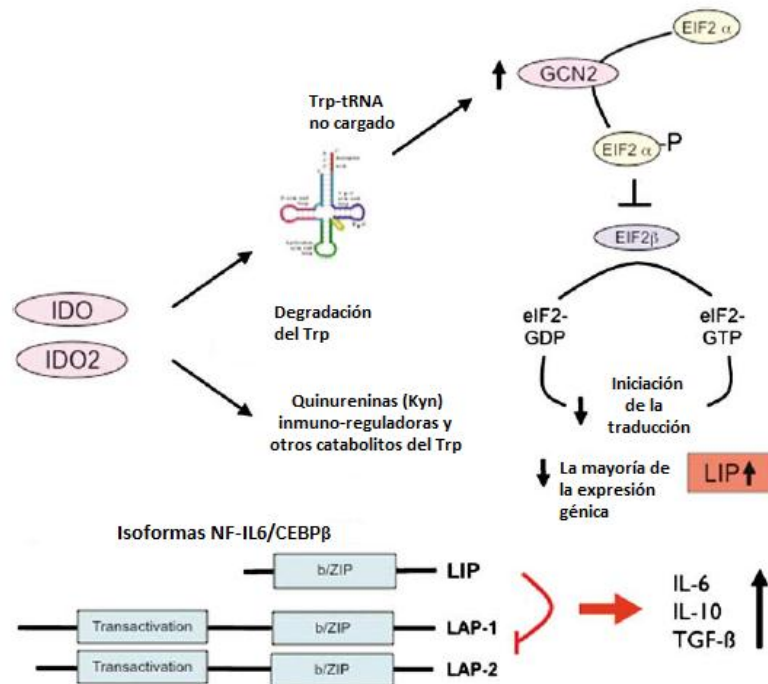
resultar deletéreo para el organismo, pero también ayuda a evitar el daño tisular durante una respuesta inflamatoria.

Cuando IDO se expresa en CD, la actividad de esta enzima suprime la inmunidad adaptativa mediada por células T (Mellor, 2005; Scheler et al, 2007; Katz, et al, 2008; Wee et al, 2008). En un experimento innovador llevado a cabo por Munn y Mellor (1999) se vio que la actividad de IDO está relacionada con la inmunosupresión, ya que al inhibir la actividad de IDO por medio del 1-metil-triptófano (1-MT) en ratones hembra preñados, se inducía un rechazo, por medio de un aborto, del feto. Lo anterior confirmó la hipótesis de que el agotamiento del W en la interfase materno-fetal evitaba la activación de linfocitos T en contra de los antígenos fetales (Mellor et al, 1999). Además de este ejemplo se han hecho varios estudios en los cuales se demuestra que la actividad de IDO resulta en la supresión de respuestas inmunes.

La inmunosupresión mediada por IDO está relacionada con el agotamiento de W en el medio intercelular y la acumulación de los catabolitos del W. Esto sucede cuando las CD expresan IDO, expresión inducida principalmente por IFN- $\gamma$  durante la respuesta inmune, y afecta a las células T, ya que tienen un punto de control regulado por el W en su ciclo celular lo cual provoca anergia, apoptosis y arresto en del ciclo celular (Mellor et al, 2005; Scheler et al, 2007; Wee et al, 2008; Jürgens et al, 2009). En células T, la falta de W debido a la actividad de IDO en CD activa la vía de señalización de estrés mediada por Gcn2 (cinasa que se activa cuando el tRNA no se carga con su aminoácido correspondiente) (Guo et al, 2007) la cual provoca la fosforilación del factor iniciador de la traducción eIF2 $\alpha$  y, por lo tanto, la iniciación de la traducción en los ribosomas se detiene dando lugar a detención en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular y anergia (Mellor, 2005; Katz et al, 2008). Una vez que se fosforila eIF2 $\alpha$ , éste incrementa su afinidad por el factor iniciador de la traducción eIF2 $\beta$  (factor intercambiador de nucleótidos de guanina, requerido para reciclar eIF2GDP a eIF2GTP). La fosforilación en la serina 51 atrapa al eIF2GDP y al eIF2 $\beta$  en un complejo con actividad reducida de factor intercambiador de nucleótidos de guanina, lo cual reduce los niveles de eIF2GTP y da como resultado la inhibición de la síntesis de proteínas (Kazemi et al, 2004), a excepción de la síntesis mediada por ciertos factores como LIP, una isoforma alternativa del factor de transcripción NF-IL6 del tipo b/ZIP (motivos ricos en leucinas que se encuentran en la parte de la proteína que se une al DNA), también conocido como CEBP $\beta$ . LIP actúa como un inhibidor dominante natural de las isoformas LAP-1 y LAP-2 ya que no presenta un dominio de transactivación, lo cual le permite actuar competitivamente con las otras dos isoformas para unirse a los promotores génicos. La inducción de LIP altera la expresión de citocinas como IL-10 y TGF- $\beta$ , lo cual crea un ambiente más tolerogénico (Figura 4) (Prendergast, 2008).

Otro mecanismo por medio del cual se promueve la expresión de IDO en CD y la inducción de tolerancia es por la unión CTLA-4:B7. La molécula CTLA-4 es expresada en células T no activadas, pero sus niveles en la superficie de éstas células es muy baja, aun así es suficiente para inducir una señal negativa (Fernández-Ponce et al, 2006). Las células Treg que expresan constitutivamente CTLA-4 en su superficie han mostrado que promueven la actividad de IDO en CD a través de un mecanismo dependiente de CTLA-4 (Katz et al, 2008). En CDt, la inducción de IDO (bajo el control de la vía CTLA-4:B7 que produce una estimulación autocrina de IFN- $\gamma$  en CD, el cual resulta en la expresión de IDO) actúa en un ciclo de retroalimentación positiva para instruir a las células T CD4<sup>+</sup> *naïve* para que se conviertan en células Treg, pero también para

mediar la habilidad de las células Treg para reclutar CD inmaduras a un estado tolerogénico (Prendergast, 2008).



**Figura 4.** En este esquema se muestra el efecto del agotamiento de W (debido a la expresión de IDO) en la CD. Tiene un impacto en la traducción de ciertos genes que promueven tolerancia y en la progresión del ciclo celular. Modificado de Prendergast, 2008.

### Cáncer e IDO

El cáncer es un crecimiento anormal de células causado por múltiples cambios en la expresión génica dando como resultado un balance no regulado en la proliferación y muerte celular, y al final en la evolución de una población de células que pueden invadir tejidos y hacer metástasis a sitios lejanos, causando una morbilidad significativa, y si no son tratados, causa la muerte del hospedero. Las células tumorales, o neoplasias, pueden ser atacadas en el cuerpo por una gran variedad de mecanismos, en los que se incluyen: 1) la activación de macrófagos por IFN- $\gamma$  para que produzcan TNF-2 e intermediarios de oxígeno, como el óxido nítrico (NO), que puede inducir la muerte de la célula objetivo; 2) activación de células NK por IL-2 y otros efectores para convertirse en asesinos activos de células tumorales; 3) producción de anticuerpos en contra de antígenos asociados a tumor lo que resulta en el revestimiento de las células tumorales, por lo que se vuelven objetivos de macrófagos y células T citotóxicas (a este proceso se le denomina inducción de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, o ADCC); 4) Muerte de células tumorales mediada por complemento; 5) activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> para convertirse en linfocitos T citotóxicos por medio de un mecanismo de aniquilación de células dependiente de MHC. Las reacciones más importantes para eliminar células tumorales son las mediadas por células como las respuestas por linfocitos T citotóxicos, macrófagos y células NK (Ruddon, 2007).

Las células tumorales tienen numerosos antígenos que pueden ser reconocidos por células T. Algunos de éstos antígenos pueden ser expresados exclusivamente por tumores y por eso se les denomina antígenos específicos de tumor (éstos antígenos se forman a partir de mutaciones o translocaciones de genes celulares normales). Otro grupo de antígenos son los antígenos asociados a tumor, que no sólo se expresan en células tumorales, sino que también son expresados por otras células del cuerpo (ejemplos de éstos antígenos son MAGE, BAGE y GAGE). A pesar de la presentación de antígenos por células malignas y la presencia de células inmunes que podrían actuar potencialmente en contra de las células malignas, en muchos casos el sistema inmune no se activa e ignora al tumor (Igney et al, 2002). Los tumores que crecen en sitios inmuno-privilegiados (*i.e.* todos los sitios locales en los que los antígenos provocan inesperadamente respuestas inmunes débiles o no respuestas, como por ejemplo el ojo, el sistema nervioso central, la placenta y los testículos) (Mellor et al, 2008) no son vigilados por el sistema inmune. Los sitios inmuno-privilegiados son utilizados por el tumor como mecanismo de escape inmunológico. El escape inmunológico es una característica esencial para la progresión de la enfermedad, en este caso del tumor, actuando como un modificador biológico para dictar la respuesta de una lesión iniciada oncológicamente. Cuando el escape inmunológico no está presente, el tumor puede ser eliminado o puede estar presente en un prolongado estado oculto de equilibrio inmunológico (latencia) (Prendergast, 2008). Se han identificado otros mecanismos que utilizan los tumores para escapar del rechazo mediado por el sistema inmune, algunos de estos mecanismos son: ignorancia inmunológica (falta de señales de daño como los antígenos tumorales), presentación antigénica dañada, expresión de factores y moléculas inmuno-supresivas como IL-10 y TGF- $\beta$ , inducción de tolerancia, resistencia a la apoptosis y el contrataque tumoral (mediado por la unión CD95:CD95L) (Igney et al, 2002). La inducción de tolerancia como estrategia de escape inmunológico incluye a CDt, células Treg y células supresoras derivadas de precursor mielóide (MDSC). Este tipo de células son muy abundantes en los tumores, ganglios linfáticos de drenaje de tumor y en tejidos periféricos de animales que presentan tumores. En las CDt que instruyen a las células T y estimulan tolerancia hacia los antígenos, las vías de señalización de los receptores B7 son de importancia vital para la supresión inmune y la tolerancia. En esencia, los ligandos B7 inhibidores definen a una CDt que tolerizará a una célula T hacia el antígeno que será presentado. En este contexto, las CDt también son importantes ya que instruyen y reclutan células Treg que propagan la supresión inmune hacia antígenos tumorales (Prendergast, 2008).

Se ha descubierto otro mecanismo de escape inmunológico relacionado con alteraciones metabólicas llevadas a cabo por células cancerosas. El catabolismo microambiental de aminoácidos esenciales como el triptófano y la arginina, llevados a cabo por las enzimasIDO y arginasa, respectivamente, está involucrado en la tolerancia inmunológica (Prendergast, 2008). La expresión de IDO en células tumorales, o su expresión de CPA asociadas a tumor, puede inhibir las respuestas de células T hacia los antígenos tumorales, al suprimir la activación de las células T en los ganglios linfáticos de drenaje de tumor o al volver a las células T efectoras activadas inefectivas en el sitio del crecimiento del tumor (Mellor, 2005).

La expresión del gen *Bin1* restringe IDO a nivel de la transcripción regulada por IFN- $\gamma$  al limitar la inducción del mensaje de IDO enviado por STAT1 y NF- $\kappa$ B, dos reguladores clave de inmunidad y cáncer (Muller et al, 2005). El gen *Bin1* codifica el miembro prototípico de la

familia de proteínas adaptadoras BAR. La función de estas proteínas es coordinar la dinámica membranal y procesos de señalización. Sin embargo, miembros de ésta familia como las proteínas Bin1 y APPL también se localizan en el núcleo donde se han visto implicadas en represión transcripcional (Prendergast, 2008). La expresión atenuada de *Bin1* ocurre en muchos tipos de cánceres como en senos, próstata, pulmón y colon (Muller et al, 2005; Prendergast, 2008), así como en neuroblastoma y melanoma. La atenuación de este gen ocurre tan comúnmente en las células de cáncer ya que beneficia al escape inmunológico. Se ha encontrado que la presencia de *Bin1* ayuda fuertemente a la inmuno-vigilancia mediada por células T, ya que se inhibe al inhibidor de la inmunidad mediada por células T: IDO, es por ello que en las células tumorales se atenúa este gen (Prendergast, 2008).

Por otro lado, Munn y Mellor (1999) encontraron que el gen *IDO* es ancestral, ya que en los invertebrados existe un gen homólogo para esta proteína. A partir de esto, se ha cuestionado el hecho de porqué se ha conservado esta proteína si ya existe otra (la TDO) que lleva a cabo el catabolismo del W. Se piensa que la función de IDO no es catabolizar simplemente el W en exceso proveniente de la dieta (Prendergast, 2008), sino que el catabolismo de este aminoácido por medio de esta enzima es una estrategia de supervivencia ancestral que puede controlar las respuestas inmunes en los mamíferos (Pallota et al, 2011).

#### ***Utilización de IDO en inmunoterapia***

La inmunoterapia es un tipo de tratamiento que utiliza herramientas inmunológicas, tales como anticuerpos monoclonales, proteínas fusionadas receptor-inmunoglobulina, vacunas y células inmunes, entre otros (Feldmann et al, 2005). En este contexto, la modulación de la expresión de IDO, ya sea una modulación positiva o negativa, puede usarse como herramienta inmunológica para combatir enfermedades autoinmunes, cáncer o en el rechazo de injertos. En el caso de la inmunoterapia en contra de cáncer, la meta es provocar respuestas inmunes efectivas en contra de antígenos tumorales para explotar la especificidad exquisita del sistema inmune adaptativo para atacar tumores (Mellor, 2005). Debido a que la expresión de IDO en células tumorales provoca el escape inmunológico de éstas células, se ha visto que la inhibición de esta enzima en células cancerosas resulta en la regresión tumoral cuando se combina con agentes quimioterapéuticos (Prendergast, 2008), ya que el sistema inmune es capaz de reconocer y atacar al tumor. Uno de los inhibidores de la actividad de IDO más usados es el 1-metil-triptófano (1-MT), el cual actúa competitivamente con el triptófano (Prendergast et al, 2008; Wee et al 2008; Sun et al, 2010). La expresión de IDO también podría ser usada como herramienta inmuno-terapéutica cuando la respuesta inmune no es deseada como en el rechazo de injertos. En este caso, existen estudios en los que se induce la expresión de IDO, *in vitro* o *in vivo*, para inducir tolerancia y evitar las respuestas de células T en contra del donador (Morelli et al, 2008). En el caso de enfermedades autoinmunes se ha encontrado, paradójicamente, que la expresión de IDO aumenta en este tipo de patologías (Szantó et al, 2007; Scott et al, 2009) y que, incluso cuando se inhibe su expresión en modelos murinos de artritis reumatoide, la artritis se retrasa y se alivia la gravedad de la enfermedad (Scott et al, 2009). La utilización de IDO como herramienta inmuno-terapéutica ya se ha probado con resultados efectivos, pero debido a la falta de estudios básicos en la actividad de esta enzima, no se han podido explicar muchos resultados que se han obtenido a partir de este tipo de investigaciones.

## Antecedentes

Existen trabajos previos en los cuales se ha investigado el efecto que tienen la enzima IDO sobre CD en cultivo. El objetivo general de estos trabajos es aplicar la expresión de IDO en la inmunoterapia y tener un mejor entendimiento sobre la tolerancia inmunológica mediada por CD. Ganesh y cols. (2009), analizaron la posibilidad de que la población de células dendríticas CD8 $\alpha^+$  y CD8 $\alpha^-$  adquieran la habilidad para generar células Treg a partir de células T efectoras (activadas con el antígeno mTg, que causa la tiroiditis autoinmune experimental) después de haber sido generadas *in vivo* por medio de la estimulación con 2 $\mu$ g de GM-CSF inyectado intraperitonealmente durante 5 días seguidos, en dos ocasiones; al término del tratamiento se obtuvieron CD de bazo. Se concluyó que el GM-CSF actúa principalmente sobre las CD CD8 $\alpha^-$  y las vuelve tolerogénicas, especialmente porque adquieren la capacidad de inducir/expandir células Treg FOXP3 $^+$  IL-10 $^+$ , las cuales son capaces de suprimir células T autorreactivas a través de un mecanismo dependiente de IL-10. El descubrimiento de ésta población de CD tolerogénicas, inducidas por el GM-CSF, es importante ya que esta citocina es empleada de manera habitual en los protocolos de diferenciación de CD *in vitro*.

Por otro lado, Jürgens et al (2009), demostraron que la abundante expresión de IDO, así como su actividad (denominada IDO competencia) en CD derivadas de monocitos humanos, después de haber sido activados con LPS (50ng/ml) depende de la presencia de IFN- $\gamma$  (1000U/ml) durante 4hrs o 48hrs. También se relacionó la expresión de IDO con la expresión de citocinas proinflamatorias. Se concluyó que el IFN- $\gamma$  estimula a las CD para liberar citocinas proinflamatorias y desarrollar la IDO competencia en paralelo, pero con una cinética temporal diferente. Mientras la liberación de citocinas prevalezca y la IDO competencia se desarrolle completamente, las CD podrían estimular una respuesta celular T proinflamatoria. Sin embargo, cuando la producción de citocinas cesa, la actividad de IDO iniciada por IFN- $\gamma$  se vuelve prevalente. Las CD IDO competentes inhiben las respuestas de células T. Éstos descubrimientos son de suma importancia ya que se demuestra que la expresión de IDO puede ser inducida y que las CD pueden tener paralelamente programas celulares diferentes. Aunado a éstos descubrimientos, en un trabajo hecho por Hwang y sus colaboradores (2005), se demostró que las CD inmaduras derivadas de monocitos, en cultivo, expresan constitutivamente altos niveles de IDO (80% de las células expresan IDO). También demostraron el efecto de la falta de W en la regulación del fenotipo, la capacidad disminuida de estimular células T en cocultivos de CD con células T y el comportamiento quimiotáctico potente de las CD inmaduras. Encontraron que al aumentar la expresión de IDO, debido al estímulo con TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  o CD40L, también se aumenta la expresión de CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-DR con respecto al grupo control sin estímulo. Los resultados anteriores dan indicio de que existe una posibilidad de encontrar una relación directa entre la expresión de moléculas membranales y citocinas inflamatorias con la expresión de IDO.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En diversos estudios de inmunoterapia se utilizan a las células dendríticas como inductores de respuestas inmunológicas. Para poder saber que tipo de respuesta son capaces de inducir estas células es necesario conocer el tipo de CD que se obtienen a partir de protocolos de diferenciación. Por lo tanto, es importante estudiar Qué relación existe entre el inmunofenotipo de células dendríticas diferenciadas a partir de médula ósea y la expresión, en estas mismas células, de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa.

## JUSTIFICACIÓN

Actualmente se han propuesto numerosos protocolos para el desarrollo de vacunas y estrategias terapéuticas antitumorales y para enfermedades autoinmunes, basados en la utilización de células dendríticas diferenciadas a partir de monocitos, los resultados en dichos protocolos son prometedores. Debido a que las CD tienen la capacidad de producir tolerancia mediante la expresión de IDO, el estudio de los efectos de esta enzima en éstas células adquiere gran relevancia ya que su modulación puede utilizarse como herramienta inmunoterapéutica para combatir enfermedades autoinmunes, cáncer y otras enfermedades, en las cuales la tolerancia inmunológica participa en el desarrollo de la enfermedad. Es por ello que en este trabajo se ha decidido usar CD diferenciadas a partir de médula ósea para éste propósito.

## HIPÓTESIS

Si se modifica la expresión *in vitro* de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa en células dendríticas diferenciadas de médula ósea con GM-CSF mediante la utilización de inductores (IFN- $\gamma$  y LPS) las moléculas CD40, CD80, CD86 disminuirán, mientras que las moléculas CCR7, CD273, CD274, IL-10 y MHCII aumentarán con respecto a las células dendríticas cultivadas sin inductores.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Determinar si la expresión de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa tiene una relación con la expresión del inmunofenotipo de las células dendríticas diferenciadas de médula ósea con GM-CSF.

### Objetivos particulares

1. Demostrar la expresión de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa en CD derivadas de médula ósea en cultivo en presencia y ausencia de IFN- $\gamma$ , LPS y su combinación.
2. Evaluar la expresión mediante citofluorometría de flujo de: CCR7, CD8 $\alpha$ , CD11c, CD40, CD80, CD86, CD273, CD274, IDO, IL-10 y MHCII en CD derivadas de médula ósea que expresan IDO.



## MATERIAL Y MÉTODO

### **Diferenciación de células dendríticas a partir de células de médula ósea**

Para cada serie de cultivos experimentales, se utilizaron 3 ratones machos de la cepa Balb/c de 6 a 8 semanas de edad, que fueron mantenidos en las instalaciones del bioterio del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM, bajo condiciones controladas de luz-oscuridad, temperatura y de alimentación *ad libitum*, que fueron sacrificados por necesidades del experimento por dislocación cervical. Se obtuvieron el fémur y la tibia de ambas extremidades posteriores y bajo condiciones asépticas. Las células de médula ósea fueron extraídas (dentro de una campana de flujo laminar) de los huesos obtenidos por perfusión y sembradas en una botella de cultivo con medio DMEM completo (Suero bovino fetal 10% y antibiótico/antimicótico 1%) suplementado con sobrenadante al 20% (v/v) del factor GM-CSF, obtenido a partir del cultivo de la línea celular de cáncer de ovario de hámster chino: CHO (transfectada con el gen GM-CSF) durante 10 días para inducir diferenciación, con remplazo del medio total cada tercer día. El medio de cultivo también fue suplementado con 55µmol/L del antioxidante β-mercaptoetanol de Sigma. Al día 10 se realizó un conteo celular en la Cámara de Neubauer y se obtuvo viabilidad celular con azul tripano. Para la obtención del sobrenadante de células CHO, ésta línea celular fue cultivada en medio F12 completo (suero bovino fetal 10%; solución de antibióticos y antimicóticos al 1%: penicilina, estreptomycin y anfotericina; antibiótico de selección: Geneticina) para su expansión durante 3 pases con una confluencia del 80-90%. Posteriormente, se sembraron en medio F12 completo (suero bovino fetal 10%; solución de antibióticos y antimicóticos al 1%: penicilina, estreptomycin y anfotericina) durante 3 pases con una confluencia del 80-90%. Finalmente, se sembraron las células en medio F12 semiplano (solución de antibióticos y antimicóticos al 1%: penicilina, estreptomycin y anfotericina) durante 72hrs y se obtuvo el sobrenadante. Para cada pase se utilizó tripsina al 0.05% resuspendida en solución salina balanceada de Hanks (HBSS) para despejar las células adheridas a la botella de cultivo.

### **Procesamiento de células dendríticas para microscopía fotónica y electrónica**

#### ***Tinción de Giemsa***

Después de los 10 días de diferenciación se obtuvo una muestra del cultivo, se hicieron lavados con PBS. A partir de esta muestra se realizó un frotis en una laminilla cubierta con poli-L-lisina. Posteriormente se fijó con glutaraldehído 10%, se lavó la muestra con PBS y se colocó en Giemsa 1x durante 10 minutos. Se observó en el Microscopio Nikon Eclipse 80i en el campo claro a diferentes aumentos y se obtuvieron fotografías.

#### ***Inmunocitoquímica para moléculas clase II del MHC***

Después de los 10 días de diferenciación se obtuvo una muestra de células del cultivo y se realizaron lavados con PBS. A partir de esta muestra se realizó un frotis en una laminilla cubierta con poli-L-lisina. Posteriormente se fijaron con fijador Zamboni, se lavaron con PBS y se incubaron con peróxido de hidrógeno a temperatura ambiente y se lavó la muestra con PBS. Posteriormente, se incubó con PBS/albúmina 5% durante 1hr a 37°C. Se retiró el PBS/albúmina

y se incubó con anti-MHCII (Neomarker) a 4°C por 24hr. Pasado ese tiempo, se lavó con PBS y se incubó con PBS/albúmina 0.1% 10 min a temperatura ambiente. Se retiró el PBS/albúmina y se incubó con el anticuerpo secundario cabra anti-rata biotinilado (MP Biomedicas) 30 min a 37°C. Se lavó con PBS y posteriormente se incubó con el complejo Horseradish Peroxidase (HRP, estreptavidina-peroxidasa) (MP Biomedicas) 30 min a 37°C. Se lavó con PBS y se reveló con el kit diaminobenzidina (DAB) (Zymed) por 5 min. Se observó en el Microscopio Nikon Eclipse 80i en el campo claro a diferentes aumentos y se obtuvieron fotografías.

### ***Microscopía electrónica de barrido***

A partir de un cultivo de CD de 10 días se obtuvo una muestra y se lavó con buffer de cacodilatos para quitar el exceso de medio de cultivo y se fijaron las células con glutaraldehído al 2.5% durante 15 min a 4°C; se post-fijó con tetraóxido de osmio al 1%. Posteriormente, se deshidrató la muestra con acetona y se desecó a punto crítico con CO<sub>2</sub>. Después, se cubrió la muestra con una película de oro y por último la muestra fue observada con un Microscopio Zeiss DSM50 (1987).

### **Estimulación de la expresión deIDO en células dendríticas**

Pasados 10 días de diferenciación, se dividieron las células del cultivo en 4 grupos: 1) control sin estímulo, 2) estimulado con IFN- $\gamma$ , 3) estimulado con LPS y 4) estimulado con IFN- $\gamma$  y LPS. El grupo control se lavó y sembró en medio fresco por 48hrs. El grupo 2 se lavó y sembró en medio fresco y se estimuló con 1000U/ml de IFN- $\gamma$  durante 48hrs. El grupo 3 se lavó y sembró en medio fresco y se estimuló con 50ng/ml de LPS durante 48hrs. El grupo 4 se lavó y sembró en medio fresco y se estimuló con 1000U/ml de IFN- $\gamma$  y 50ng/ml de LPS por 48hrs.

### **Evaluación del inmunofenotipo de células dendríticas**

Después de estimular a las CD con los diferentes tratamientos, se llevaron a cabo varias inmunofluorescencias. Los anticuerpos fluorocromados utilizados fueron: FITC anti-I-A/I-E (reconoce MHCII de ratón), FITC anti-CD80, PE anti-CD40, PE anti-CD86, PE anti-CD273, PE anti-CD274, PE-Cy5 anti-CD8 $\alpha$  (BD Biosciences) y APC anti-CD11c (BIOLEGEND). Los anticuerpos biotinilados utilizados fueron: conjugado con Biotina anti-CCR7, conjugado con Biotina anti-IL-10 (eBiosciences); éstos anticuerpos biotinilados posteriormente fueron incubados con Estreptavidina-FITC (BD Biosciences). El anticuerpo purificado anti-IDO (Millipore), fue incubado con un anticuerpo secundario cabra-anti-ratón biotinilado (MP Biomedicas) y por último fue incubado con Estreptavidina Cy5 (BD Biosciences). Al final de la tinción, todas las muestras fueron fijadas en PBS/Paraformaldehído 0.5%. Para identificar la expresión de éstas moléculas, las muestras fueron leídas en el citofluorómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences). El análisis de los datos generados fue hecho en el programa FlowJo v8.7.

## RESULTADOS

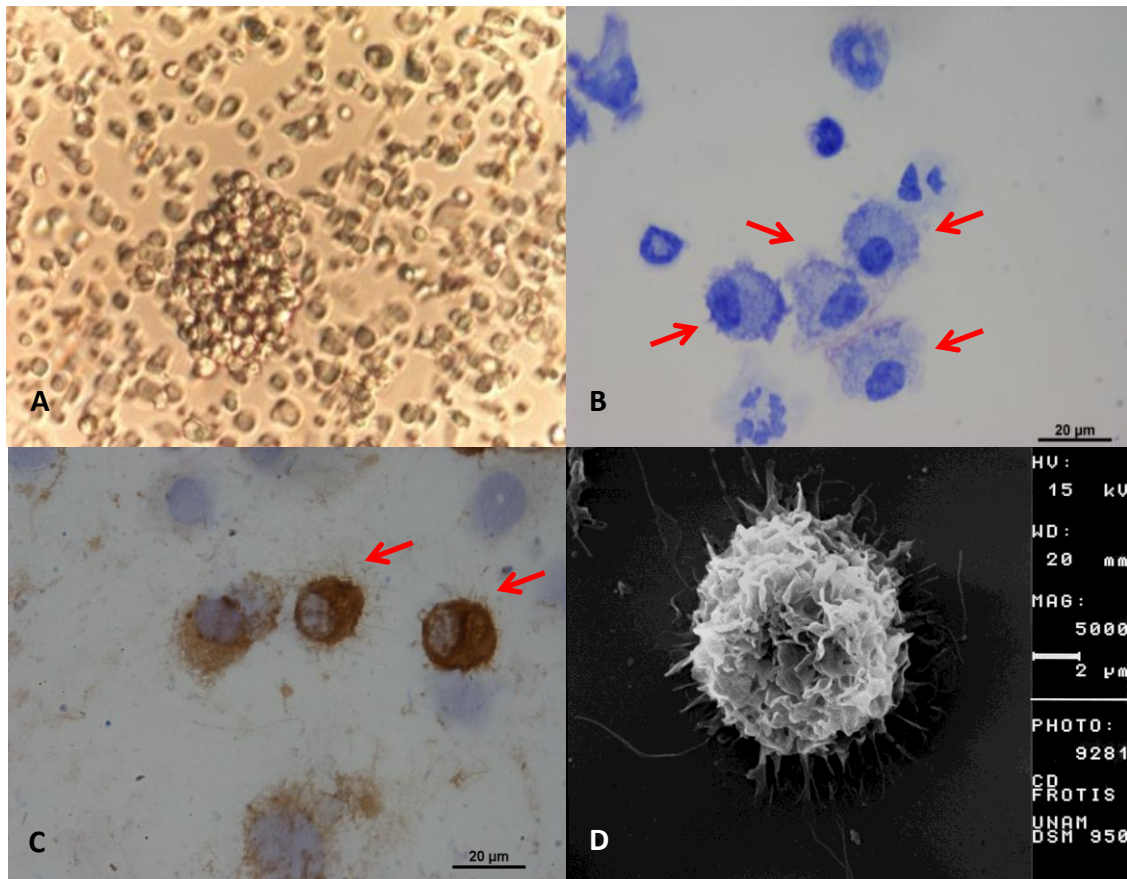
### Diferenciación de células dendríticas a partir de células de médula ósea

La suspensión celular obtenida de la médula ósea de ratones Balb-c fue mantenida en cultivo durante 10 días con un medio de cultivo completo suplementado con el factor GM-CSF obtenido del sobrenadante del cultivo de la línea celular de cáncer de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con el gen del GM-CSF de acuerdo al procedimiento descrito previamente en la sección de material y métodos. Con la finalidad de corroborar el proceso de diferenciación de las células de médula ósea en CD, se realizó tanto un seguimiento de las características morfológicas de dichas células, así como una evaluación de la expresión de la proteína CD11c mediante citofluorometría de flujo.

Tras 12 horas de cultivo la mayoría de las células estromales de la médula ósea y los macrófagos preexistentes se adhieren fuertemente al piso de la placa de cultivo, adquiriendo una morfología similar a la de los fibroblastos *in vitro*, mientras que las células hematopoyéticas se mantienen en suspensión, a partir del tercer día de cultivo las células en proceso de diferenciación hacia CD comienzan a formar colonias de células débilmente adherentes de morfología esférica con presencia de numerosas proyecciones citoplasmáticas cortas sin ramificaciones (Figura 5A), conforme avanza el proceso de diferenciación en el cultivo celular el número de colonias y el número de células en cada colonia se incrementa.

Posteriormente, al día 10 de cultivo se colectaron varias muestras celulares, las cuales fueron teñidas con la tinción de Giemsa, en donde se observó una alta densidad de células de morfología esférica con numerosas proyecciones citoplasmáticas delgadas y cortas, con núcleos grandes e indentados (Figura 5B). Por otra lado, algunas de las muestras fueron procesadas mediante la técnica de inmunocitoquímica utilizando anticuerpos dirigidos contra las moléculas de clase II del MHC, observando una elevada correlación entre la forma y la positividad al marcador MHCII de las células evidenciadas con la tinción de Giemsa y las células MHCII<sup>+</sup> (Figura 5C). Finalmente algunas otras muestras fueron procesadas para microscopía electrónica de barrido, en las que se encontraron células con abundantes proyecciones citoplasmáticas (Figura 5D), que corresponden a las CD diferenciadas.

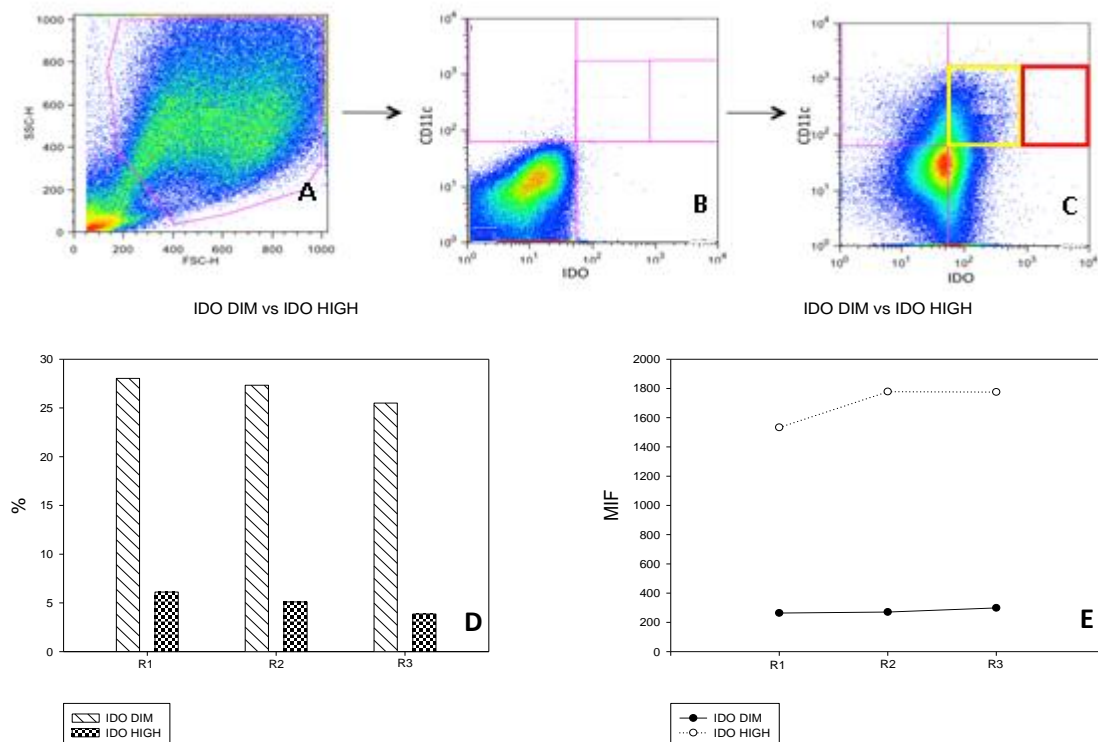
Posterior a la evaluación morfológica, en los cultivos de 10 días se evaluó la viabilidad celular mediante la utilización del colorante azul tripano, encontrando en todos los cultivos evaluados una viabilidad superior al 85%. Finalmente mediante citofluorometría de flujo se determinó el porcentaje de CD presentes en el cultivo, evaluando la presencia de la molécula CD11c en la superficie celular, obteniendo que entre el 30% y el 50% de las células en suspensión corresponden a CD.



**Figura 5.** En este panel se muestran cuatro fotomicrografías de CD procesadas con diferentes técnicas. (A) Fotomicrografía de microscopio fotónico de contraste interferencial diferencial sin teñir de una colonia de CD al día 3 de cultivo a un aumento de 20x, las células adyacentes son células estromales de médula ósea. (B) Fotomicrografía de microscopio fotónico de campo claro de CD en frotis teñidas con Giemsa. Se encontró que el conjunto de CD (flechas) presentan un tamaño celular y núcleo grandes, así como prolongaciones del citoplasma, característicos de las CD. (C) Fotomicrografía de microscopio fotónico de campo claro de CD en frotis en las que se realizó una inmunocitoquímica para revelar la presencia del MHCII, contrateñidas con hematoxilina. Las CD, positivas para este marcador (flecha), que se observan de color café con núcleos color azul claro presentan un tamaño celular y núcleo grandes, así como prolongaciones grandes y abundantes del citoplasma. (D) Fotomicrografía de microscopio electrónico de barrido de una CD. En esta imagen se observa que la CD presenta prolongaciones citoplasmáticas largas y delgadas en forma de dendritas, pero también presenta otro tipo de prolongaciones celulares más cortas y más abundantes en forma de seudópodos.

## Evaluación de la expresión deIDO en células dendríticas

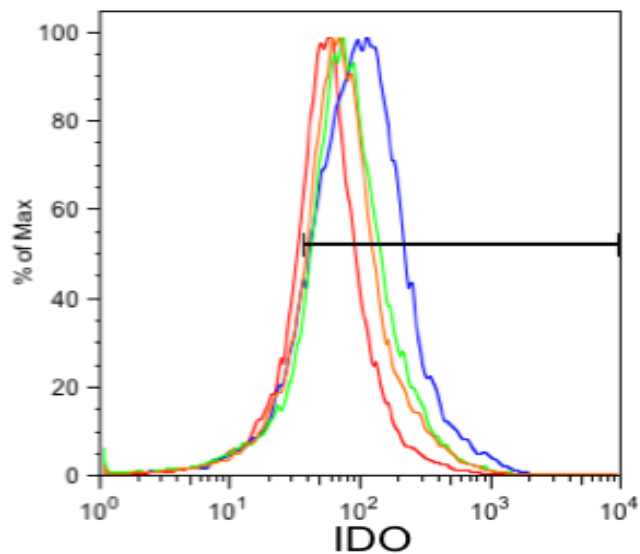
Para determinar la expresión de la enzimaIDO en las CD diferenciadas en los cultivos de médula ósea utilizados, se llevó a cabo un análisis por citofluorometría de flujo, en donde las células fueron analizadas en un principio en términos de su tamaño y granularidad, eliminando la región en donde se localizan los detritos celulares (Figura 6A), posteriormente, en la población celular seleccionada se delimitaron las regiones negativas para la expresión de la molécula CD11c y para la enzimaIDO (Figura 6B). Después se evaluó la población doble positiva para ambas moléculas (Figura 6C) en donde se encontró que existen tres subpoblaciones de CD, la primera subpoblación  $CD11c^+IDO^-$ , la segunda  $CD11c^+IDO^{dim}$  (IDO expresada a bajas concentraciones) y la tercera subpoblación  $CD11c^+IDO^{high}$  (IDO expresada a altas concentraciones). De las dos poblaciones de CD  $IDO^+$ , la población  $IDO^{dim}$  es la más abundante con un porcentaje de dobles positivas del 27% y una media de intensidad de fluorescencia (MIF) de 284.36; mientras que la población  $IDO^{high}$  corresponde solamente a un porcentaje del 4.58% de CD dobles positivas con una MIF de 1749.21, lo que permite distinguir en términos de la intensidad del marcaje dos población de CD  $IDO^+$  (Figuras 6D y 6E). Cabe mencionar que ambas subpoblaciones en conjunto representan alrededor del 31.5% del total de las células  $CD11c^+$  diferenciadas bajo estas condiciones de cultivo.



**Figura 6.** En esta figura encontramos tres gráficas tipo Dot plot hechas en el programa FlowJo v8.7 de un experimento representativo de tres, así como una gráfica de barras y otra de líneas hechas en el programa Sigmaplot 11. (A) Dot plot de tamaño celular (FSC) vs granularidad celular (SSC) de toda la población celular adquirida, se hizo una región (de color rosa) en la que se seleccionaron las células más grandes y granulosas. (B) Dot plot de IDO vs CD11c en el que se muestra la población negativa de las células marcadas para éstas moléculas. (C) Dot plot de IDO vs CD11c. En el cuadrante superior derecho se muestra la región positiva para ambas moléculas y se pueden observar dos subregiones: la amarilla que es la región  $CD11c^+IDO^{dim}$  y la roja  $CD11c^+IDO^{high}$ . Estas dos subregiones se marcaron de acuerdo al cambio en la densidad celular y la intensidad de fluorescencia. (D) En esta gráfica se muestran los datos en porcentaje de las células  $CD11c^+IDO^{dim}$  y  $CD11c^+IDO^{high}$  en tres repeticiones. Claramente se observa que la población  $CD11c^+IDO^{dim}$  es más abundante (27%) que la población  $CD11c^+IDO^{high}$  (4.58%). (E) En esta gráfica se muestran los datos de la MIF de las células  $CD11c^+IDO^{dim}$  y  $CD11c^+IDO^{high}$  en cuatro repeticiones. Se observa que la población  $CD11c^+IDO^{high}$  presenta una MIF mayor (1749.21) que la población  $CD11c^+IDO^{dim}$  (284.36).

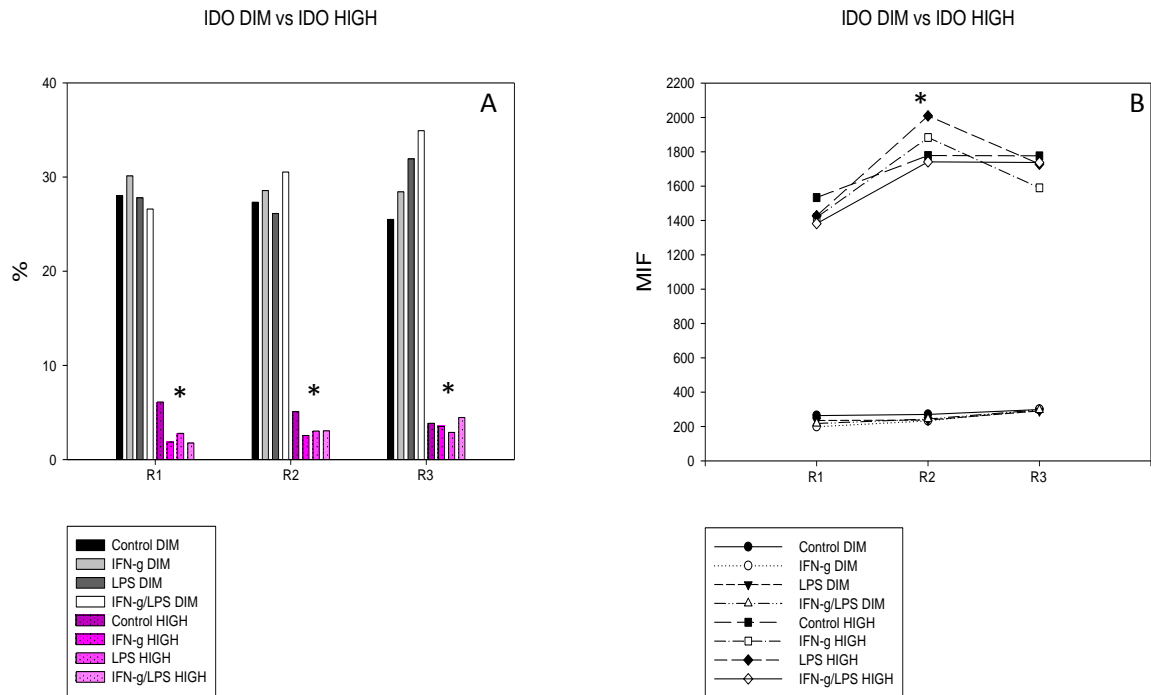
Para determinar si la expresión de la enzima IDO en estas células CD11c<sup>+</sup> diferenciadas de médula ósea bajo las condiciones de cultivo, previamente descritas, puede ser incrementada (como se ha observado en otros trabajos con CD) se decidió suplementar el medio de cultivo con algunos inductores de la expresión de IDO, por lo que se estimuló a las CD en cultivo durante 48hrs con los siguientes esquemas: 1) IFN- $\gamma$ , 2) LPS y 3) la combinación de IFN- $\gamma$ /LPS. Posteriormente se evaluó el porcentaje celular y expresión con la media de intensidad de fluorescencia de IDO total mediante citofluorometría de flujo.

Cuando analizamos los resultados obtenidos en los experimentos de estimulación, observamos que IDO se está expresando en cerca del 30% de la población de CD diferenciadas, con una MIF intermedia cuando el medio de cultivo es suplementado exclusivamente con GM-CSF. También encontramos que dicho porcentaje se modula ligeramente de manera positiva cuando el medio de cultivo es suplementado con LPS, administrado solo o en combinación con IFN- $\gamma$ . Sin embargo cuando el IFN- $\gamma$  fue adicionado de manera individual al medio de cultivo, se observó que esta citocina promueve una expresión aún mayor, sin embargo cabe señalar que en cualquiera de los medios de cultivo la expresión y porcentaje de células positivas se encuentra en el mismo rango y que no llega a existir una diferencia significativa entre los distintos tratamientos (Figura 7).



**Figura 7.** Histograma de la expresión de IDO en CD hecho a partir de la región positiva para CD11c tomando en cuenta todas las células IDO positivas del dotplot. La línea horizontal representa la región positiva de este histograma, en rojo se marca el grupo control, en azul el grupo IFN- $\gamma$ , en naranja el grupo LPS y en verde el grupo IFN- $\gamma$ /LPS. Los grupos experimentales se ven desplazados hacia la derecha con respecto al grupo control, lo cual indica un aumento en la expresión de IDO, cabe señalar que el grupo más positivo a IDO es el grupo IFN- $\gamma$ .

Cuando analizamos la expresión de IDO en las dos subpoblaciones de CD que son IDO positivas (CD11c<sup>+</sup> IDO<sup>dim</sup> y CD11c<sup>+</sup> IDO<sup>high</sup>) no encontramos una diferencia significativa entre las distintas condiciones de estimulación al interior de cada subpoblación (Figura 8A). Aunque si encontramos diferencias constantes y significativas en el número y expresión de IDO entre las dos subpoblaciones (Figura 8B).

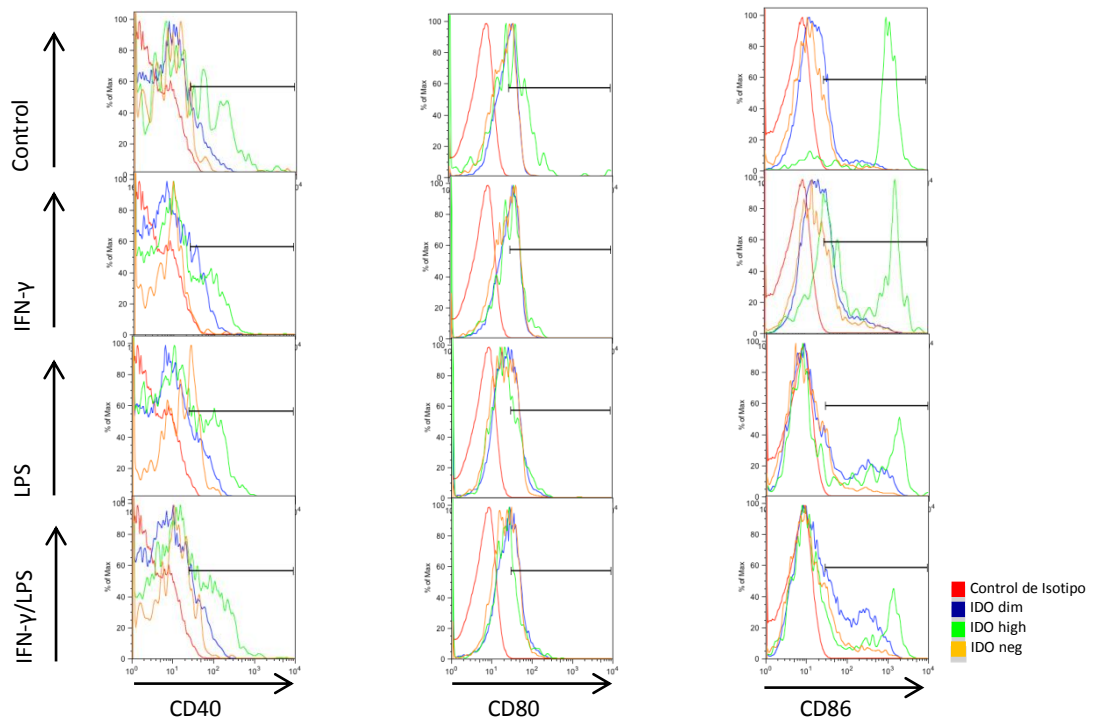


**Figura 8.** Porcentaje y media de intensidad de fluorescencia de la expresión de IDO en las dos poblaciones IDO<sup>dim</sup> e IDO<sup>high</sup> estimuladas con LPS, IFN- $\gamma$  y su combinación. A) En esta gráfica se muestran las barras en porcentaje de las poblaciones CD11c<sup>+</sup> IDO<sup>dim</sup> (escala de grises) y CD11c<sup>+</sup> IDO<sup>high</sup> (escala de morados) de tres repeticiones en las tres diferentes condiciones de inducción: IFN- $\gamma$ , LPS e IFN- $\gamma$ /LPS y en el grupo control. No se ve una diferencia significativa entre cada tratamiento de las dos poblaciones, pero la diferencia sí es significativa entre las dos poblaciones, comparando cada grupo (e.g. IFN- $\gamma$  dim vs IFN- $\gamma$  high). B). En esta gráfica se muestran los datos de la MIF de las poblaciones CD11c<sup>+</sup> IDO<sup>dim</sup> (parte inferior) y CD11c<sup>+</sup> IDO<sup>high</sup> (parte superior) de tres repeticiones en las tres diferentes condiciones de inducción: IFN- $\gamma$ , LPS e IFN- $\gamma$ /LPS y en el grupo control. No se ve una diferencia significativa entre cada tratamiento, pero la diferencia sí es significativa entre las dos poblaciones, comparando cada grupo (e.g. IFN- $\gamma$  dim vs IFN- $\gamma$  high). \* P<0.001 One way ANOVA/Tukey.

## Evaluación del inmunofenotipo de células dendríticas

Después de evaluar la expresión de IDO en los cultivos de CD e identificar las dos subpoblaciones IDO<sup>+</sup>, se evaluó la expresión de moléculas coestimuladoras (CD40, CD80 y CD86), coinhibidoras (CD273, CD274 e IL-10), de maduración (CCR7 y MHCII) y diferenciación (CD8 $\alpha$ ) en ambas poblaciones de células CD11c<sup>+</sup> IDO<sup>+</sup> y en la población CD11c<sup>+</sup> IDO<sup>-</sup>, comparando la expresión entre los grupos IFN- $\gamma$ , LPS e IFN- $\gamma$ /LPS (Figuras 9, 10 y 11).

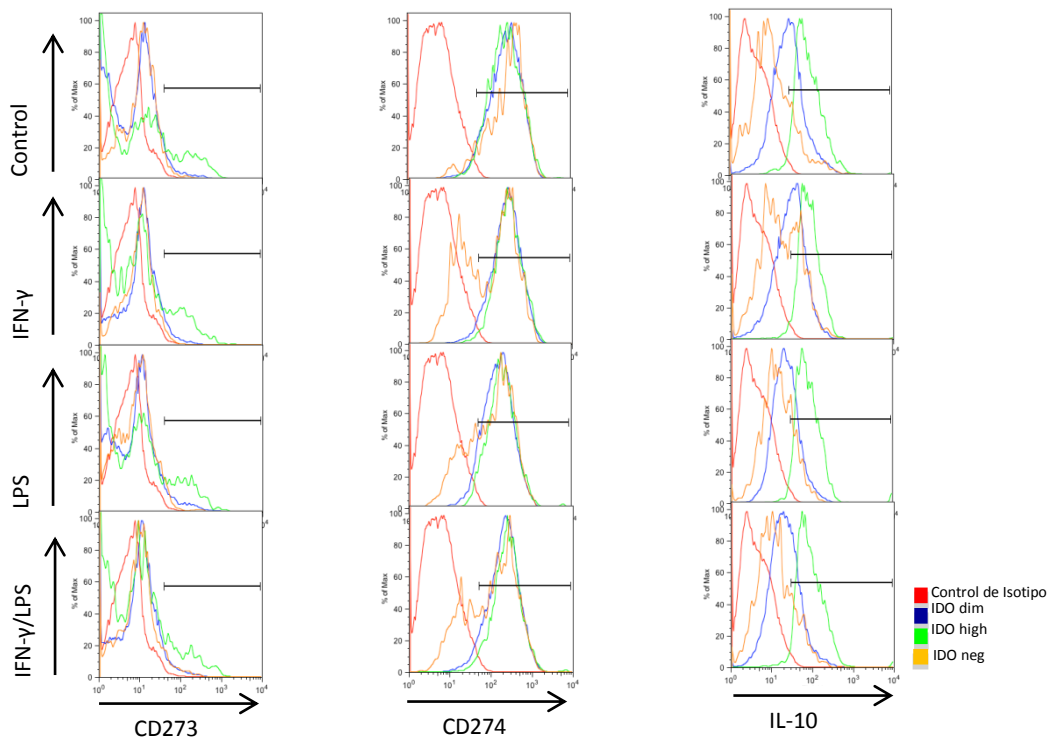
Cuando evaluamos la expresión de la molécula CD40 y las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, encontramos que en condiciones basales de cultivo (solo en presencia de GM-CSF) CD40 tiene una expresión reducida en las poblaciones IDO<sup>neg</sup> e IDO<sup>dim</sup> y mas fuertemente expresada en la población IDO<sup>high</sup>, sin embargo este patrón de expresión no se modifica al ser estimuladas las CD ni con LPS, IFN- $\gamma$  o su combinación. En cuanto a las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 encontramos que el perfil de expresión de la molécula CD80 su expresión es reducida en las tres subpoblaciones de CD en este mismo sentido observamos que el patrón de expresión no se modifica en ninguna de las poblaciones ni con alguno de los distintos estímulos de activación. En contraste la expresión de CD86 bajo condiciones basales únicamente la encontramos elevada en la población IDO<sup>high</sup>, pero cuando se estimulo con LPS solo o combinado la población IDO<sup>dim</sup> mostró un ligero incremento en su expresión (Figura 9).



**Figura 9.** En este panel se observan los histogramas de la expresión de las moléculas coestimuladoras que fueron medidas en este trabajo. Para cada molécula existen 4 cuadrantes que corresponden al grupo control, grupo IFN- $\gamma$ , grupo LPS y grupo IFN- $\gamma$ /LPS. En cada cuadrante hay 4 histogramas que representan el control de isotipo (rojo), la expresión de cada molécula cuando las células son CD11c<sup>+</sup> IDO dim (azul), CD11c<sup>+</sup> IDO high (verde), y CD11c<sup>+</sup> IDO neg (amarillo). En el eje X de cada histograma encontramos la Intensidad de fluorescencia, que representa la intensidad con que cada molécula se expresa en cada población de células, y en el eje Y se encuentra el porcentaje de células que expresan dicha molécula.



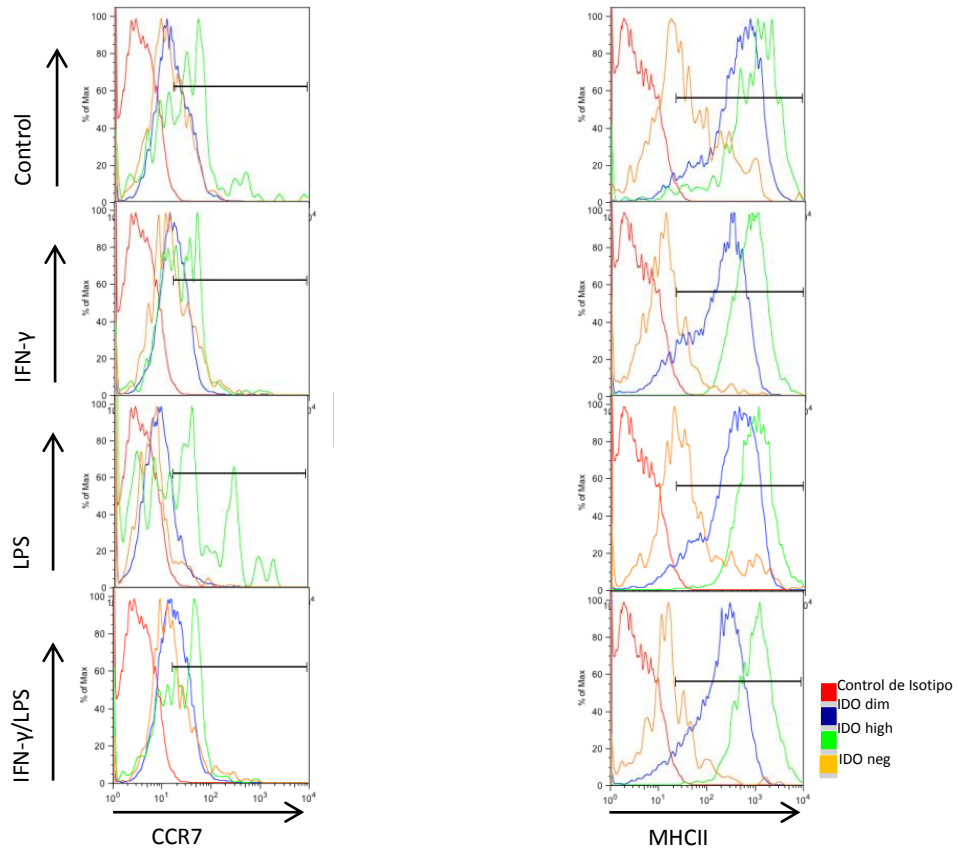
Al evaluar la expresión de las moléculas coestimuladoras negativas o coninhibidoras y la de interleucina 10, pudimos observar nuevamente una diferencia entre la población IDO<sup>high</sup> con el resto de las CD, donde sólo ésta población mostró, bajo condiciones basales de cultivo, una expresión moderada de CD273 misma que fue ausente en las otras dos poblaciones de CD, y nuevamente el patrón de expresión no se modifica con las condiciones de estimulación. Cuando analizamos a la molécula CD274 encontramos que tiene una expresión moderada y similar en las tres poblaciones de CD tanto en condiciones basales como de estimulación con LPS e IFN- $\gamma$ . Por otra parte al evaluar a la citocina antiinflamatoria IL-10 bajo condiciones basales de cultivo se observó una expresión diferencial con un ligero incremento gradual en las tres poblaciones de CD, es decir débilmente expresada en IDO<sup>neg</sup>, débil a moderadamente expresada en IDO<sup>dim</sup> y moderadamente en IDO<sup>high</sup>, al igual que en las moléculas previamente analizadas el patrón de expresión no se modifica en las condiciones de estimulación (Figura 10).



**Figura 10.** En este panel se observan los histogramas de la expresión de las moléculas coninhibidoras: CD273, CD274 e IL-10. Para cada molécula existen 4 cuadrantes que corresponden al grupo control, grupo IFN- $\gamma$ , grupo LPS y grupo IFN- $\gamma$ /LPS. En cada cuadrante hay 4 histogramas que representan el control de isotipo (rojo), la expresión de cada molécula cuando las células son CD11c+ IDO dim (azul), CD11c+ IDO high (verde), y CD11c+ IDO neg (amarillo). En el eje X de cada histograma encontramos la Intensidad de fluorescencia, que representa la intensidad con que cada molécula se expresa en cada población de células, y en el eje Y se encuentra el porcentaje de células que expresan dicha molécula.

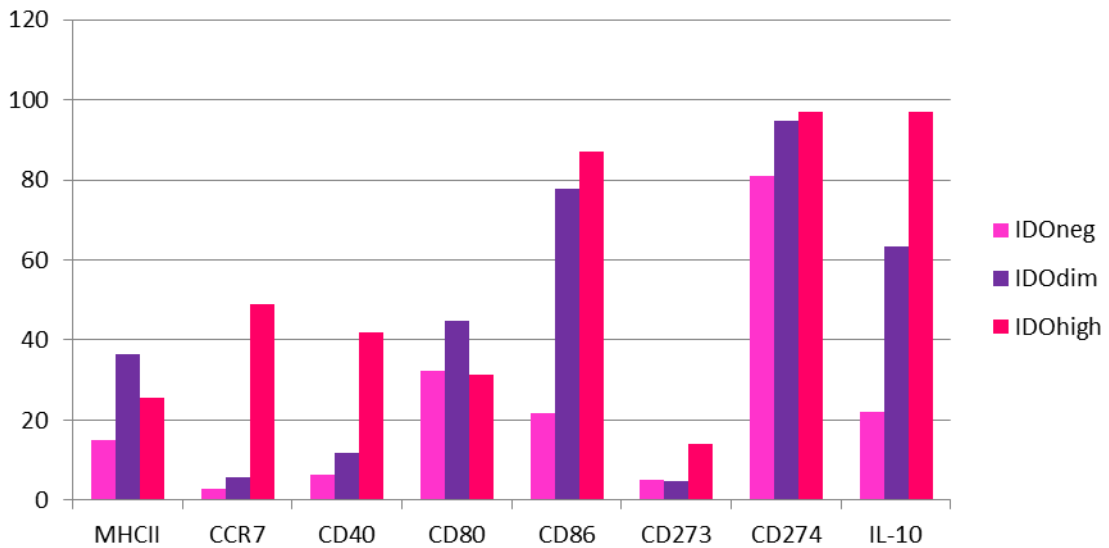
Posteriormente, al evaluar el patrón de expresión de los marcadores de maduración en células dendríticas: la quimiocina CCR7 y las moléculas clase II del MHC, observamos que bajo condiciones basales CCR7 es expresada moderadamente únicamente en la subpoblación de CD IDO<sup>high</sup>; de manera similar a lo observado con la molécula coestimuladora CD86, la expresión de CCR7 sólo se incrementa al ser estimuladas con LPS. En cuanto a las moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad se observó que las dos poblaciones IDO<sup>+</sup> cuentan con una alta expresión de ella, siendo ligeramente superior en la población IDO<sup>high</sup> con

respecto de IDO<sup>dim</sup>. Igualmente, no encontramos una modificación en los esquemas de estimulación (Figura 11).



**Figura 11.** En este panel se observan los histogramas de la expresión de las moléculas de maduración de CD: CCR7 y MHCII. Para cada molécula existen 4 cuadrantes que corresponden al grupo control, grupo IFN- $\gamma$ , grupo LPS y grupo IFN- $\gamma$ /LPS. En cada cuadrante hay 4 histogramas que representan el control de isotipo (rojo), la expresión de cada molécula cuando las células son CD11c<sup>+</sup> IDO dim (azul), CD11c<sup>+</sup> IDO high (verde), y CD11c<sup>+</sup> IDO neg (amarillo). En el eje X de cada histograma encontramos la Intensidad de fluorescencia, que representa la intensidad con que cada molécula se expresa en cada población de células, y en el eje Y se encuentra el porcentaje de células que expresan dicha molécula.

Finalmente, al comparar el porcentaje de células positivas para cada una de las moléculas del inmunofenotipo, evaluadas dentro de las tres poblaciones de CD (CD11c<sup>+</sup> IDO<sup>neg</sup>, CD11c<sup>+</sup> IDO<sup>dim</sup> y CD11c<sup>+</sup> IDO<sup>high</sup>), observamos que a excepción de MHCII y CD80 el porcentaje de células positivas para los marcadores del inmunofenotipo, dentro de cada subpoblación, siempre fue mayor en la subpoblación IDO<sup>high</sup> (Figura 12).



**Figura 12.** En esta figura se muestra una gráfica de barras en la que se representa, en porcentaje celular, la expresión de las moléculas del inmunofenotipo en las tres poblaciones de CD analizadas en este trabajo. Estas gráficas representan el promedio de dos repeticiones experimentales.

En la tabla 1 se muestra de manera resumida el fenotipo de la población de CD11c<sup>+</sup> en términos de la expresión de IDO. Es importante señalar que el fenotipo de la población IDO<sup>dim</sup> es muy parecido al de la población IDO<sup>neg</sup>, mientras que el de la población IDO<sup>high</sup> es completamente diferente al de las poblaciones IDO<sup>neg</sup> e IDO<sup>dim</sup>.

**Tabla 1.** Fenotipo de CD en las poblaciones IDO<sup>+</sup> e IDO<sup>-</sup>

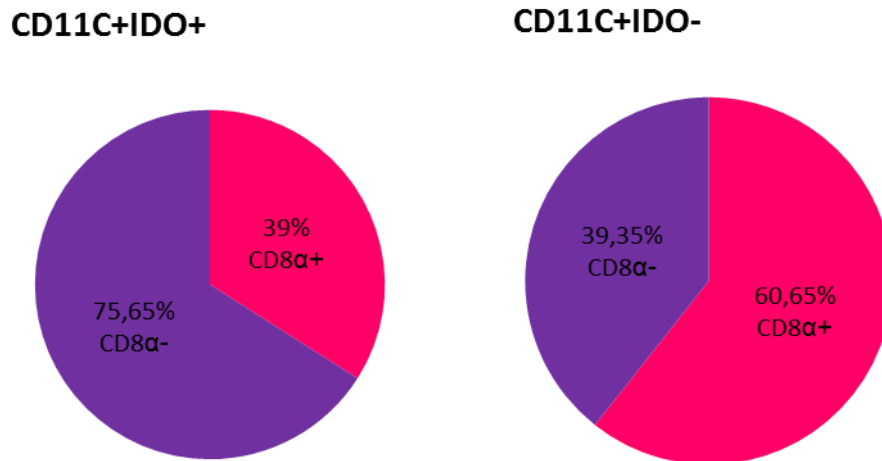
	IDO <sup>neg</sup>	IDO <sup>dim</sup>	IDO <sup>high</sup>
<b>MHCII</b>	Int	Int	Hi
<b>CCR7</b>	Lo	Lo	Lo-Int
<b>CD40</b>	Lo	Lo	Int
<b>CD80</b>	Lo	Lo	Lo
<b>CD86</b>	Lo	Lo-Int	Int-Hi
<b>CD273</b>	Lo	Lo	Int
<b>CD274</b>	Int	Int	Int
<b>IL-10</b>	Lo	Lo	Hi

Lo- bajo (low)

Int- intermedio (intermediate)

Hi- alto (high)

Posterior a estos experimentos, se realizó un grupo de experimentos para evaluar la identificación de CD tolerogénicas  $CD11c^+ CD8\alpha^-$ , relacionándolas con la expresión de IDO. En la figura 13, se observa la expresión de CD  $CD8\alpha^+$  y  $CD8\alpha^-$  en las poblaciones  $IDO^+$  e  $IDO^-$  en porcentaje celular. Cuando las CD son  $IDO^+$ , la población  $CD8\alpha^-$  es mayor que la población  $CD8\alpha^+$ ; la situación se invierte cuando las CD son  $IDO^-$ , la población  $CD8\alpha^-$  es menor que la población  $CD8\alpha^+$ .



**Figura 13.** Relación entre la expresión de IDO y  $CD8\alpha$ . En esta gráfica se representa el porcentaje de células  $CD8\alpha^+$  y  $CD8\alpha^-$  en las poblaciones de células dendríticas  $IDO^+$  e  $IDO^-$ . Se puede apreciar que en la población  $IDO^+$  se incrementa el porcentaje de células tolerogénicas  $CD8\alpha^-$ . Cuando las CD son  $IDO^-$  la población  $CD8\alpha^-$  es menor que la población  $CD8\alpha^+$ . No se presentan diferencias significativas entre las poblaciones  $CD8\alpha^+$  y  $CD8\alpha^-$ .

## DISCUSIÓN

El desarrollo y éxito de los distintos protocolos de utilización de las células dendríticas generadas o diferenciadas *in vitro* ya sea a partir de precursores de médula ósea o de sangre periférica depende en gran medida de las condiciones de cultivo en las que han sido diferenciadas, ya que de acuerdo al tipo, tiempo y concentración de citocinas utilizadas durante este proceso el fenotipo de la población de células dendríticas obtenidas puede variar considerablemente y con esto el tipo de respuesta deseado para cada protocolo en particular, por ejemplo, la misma población de precursores cultivada en presencia de una alta concentración de GM-CSF o TGF- $\beta$  produce CD con un fenotipo positivo, es decir, de células inductoras de inmunidad, mientras que aquellas que son cultivadas en bajas concentraciones de la misma citocina o su ausencia desarrollan un fenotipo tolerogénico o incluso de otras subpoblaciones de CD (Strobl et al, 1996; Lutz et al, 2000; Zia et al, 2003). En nuestro laboratorio utilizamos a las CD como herramienta terapéutica antitumoral dirigido contra el melanoma murino, por lo que la generación y selección adecuada de las CD utilizadas es crucial para el desarrollo de dicha estrategia terapéutica, por lo que para el desarrollo de este proyecto se mantuvieron las condiciones de cultivo y diferenciación mencionadas en la sección de métodos.

Para llevar a cabo el seguimiento que hicimos a nuestros cultivos con el fin de evaluar el comportamiento de las CD, se tomaron en cuenta la adherencia y formación de colonias, así como algunas características morfológicas (Patterson et al, 1991; Tan et al, 2010). Éstas características fueron evidenciadas con la tinción de Giemsa, inmunocitoquímica, igualmente con la expresión de algunos marcadores de diferenciación, como las moléculas clase II del MHC y las proteínas de adhesión CD11c (Rocha et al, 2008; Sheng et al, 2005), tal cual se observa en la figura 5, tanto en microscopía fotónica como en electrónica y citometría de flujo. Los cultivos se comportan de manera similar a lo obtenido en protocolos previos (Inaba, 1992), lo que nos sugiere que las condiciones de cultivo en términos de la concentración de GM-CSF, obtenido del sobrenadante de células CHO transfectadas con el gen del GM-CSF, son ideales para llevar a cabo la diferenciación de CD colocando el factor a una concentración final de 20% v/v con el medio de cultivo basal.

Después de verificar que el sobrenadante de las células CHO administrado al 20% v/v confiere la concentración de GM-CSF necesaria para inducir la diferenciación de CD en cultivo, se evaluó la expresión de enzima IDO en las CD diferenciadas, y de manera similar a lo reportado previamente en la literatura para CD diferenciadas a partir de monocitos (Hwang et al, 2005) en éste trabajo también se encontró dentro de las CD derivadas de médula ósea una subpoblación IDO<sup>+</sup>, constituida por aproximadamente el 30% del total de las CD obtenidas, lo cual puede ser resultado de las propias condiciones de cultivo, ya que se ha demostrado que, entre otras citocinas, el GM-CSF puede inducir su expresión y la generación de CD tolerogénicas (Ganesh et al, 2009). Notablemente, en este trabajo se demostró que dentro de esta población de CD IDO<sup>+</sup>, en términos de la intensidad de la expresión de dicha enzima, se pudieron dividir en dos subpoblaciones, la primera IDO<sup>dim</sup> correspondiente al 27% de las CD con una baja expresión de la enzima y la segunda IDO<sup>high</sup>, correspondiente al 5% con una elevada expresión de ella.

Se ha demostrado que las señales tanto de IFN- $\gamma$  como de LPS están fuertemente involucradas en el proceso de inducción de CD IDO<sup>+</sup>, (Ebner et al, 2003; Muller et al, 2005) mismo que corroboramos al suplementar el medio de cultivo con dichos inductores a las concentraciones previamente citadas en otros trabajos. Nosotros encontramos que existe un incremento en el porcentaje e intensidad de expresión de IDO en CD totales de aquellos cultivos estimulados con IFN- $\gamma$ , mientras que con LPS hubo poco aumento. Por otra parte, la ausencia *in vitro* de la molécula CD8 $\alpha$  en CD ha sido ampliamente relacionada con tolerancia y encontramos consistentemente que en la población IDO negativa, menos del cuarenta por ciento de las CD son CD11c<sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> y que dicho porcentaje se incrementa a cerca del 75% en la subpoblación CD IDO<sup>+</sup>.

Con estos datos podemos establecer que las CD que estamos utilizando para los protocolos de inmunoterapia, son muy estables y que aun cuando la expresión de la enzima IDO es constitutiva en una fracción importante de la población, la mayoría de ellas son débilmente positivas y que no se expanden fuertemente en presencia de sus inductores, lo que las hace una población estable y adecuada para el desarrollo de protocolos de inmunoterapia.

El objetivo principal de este trabajo fue relacionar la expresión de la enzima IDO en CD *in vitro* con la expresión del fenotipo: CD40, CD80, CD86, CD273, CD274, IL-10, CCR7 y MHCII. Para ello se compararon las poblaciones de CD IDO<sup>+</sup> (IDO<sup>dim</sup> e IDO<sup>high</sup>) con la población IDO<sup>neg</sup>. En general, las moléculas coestimuladoras CD40 y CD80 se mantuvieron en niveles bajos de expresión tanto en porcentaje celular como en media de intensidad de fluorescencia en las poblaciones IDO<sup>neg</sup> e IDO<sup>dim</sup>, mientras que en la población IDO<sup>high</sup> la expresión es intermedia (Figura 9). CD40 es una molécula que regula positivamente la expresión de moléculas coinhibidoras como CD80 y CD86, así como de citocinas proinflamatorias. En el trabajo llevado a cabo por Murugaiyan et al (2007), se observó que cuando la expresión de CD40 en CD es baja, la inmunogenicidad disminuye. Se sabe, también, que cuando una CD tiene una baja expresión de CD80 es capaz de suprimir la inmunidad mediada por células T ya que, cuando su expresión es baja, puede interactuar con el receptor inhibitor CTLA-4 (Tirapu et al, 2006). A partir de estos datos se pueden considerar a estas poblaciones de células como incapaces de transmitir señales de coestimulación, ya que no pueden llevar a cabo la iniciación de una respuesta inmune efectiva. Aún mas, de acuerdo a la expresión de CD40, las moléculas coestimuladoras no podrían aumentar su expresión ya que CD40 se mantiene bajo. Además, debido a que la expresión de CD80 es baja, éstas poblaciones serían capaces de crear tolerancia inmunológica por la vía CD80:CTLA-4, sin embargo este tipo de tolerancia no podría llevarse a cabo (más adelante se explicará el motivo). Un resultado contrastante en la población IDO<sup>high</sup>, es la expresión de CD86. La expresión de ésta molécula es alta en esta población pero baja en la población IDO<sup>neg</sup> e intermedia en la población IDO<sup>dim</sup>. Posiblemente, la expresión es alta en la población IDO<sup>high</sup> ya que CD86 es una molécula que se expresa a través de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Zou et al, 2005), por lo tanto, cuando se induce la expresión de IDO mediante el factor NF- $\kappa$ B (población IDO<sup>high</sup>) se podría también estar induciendo la expresión de CD86. Debido a que en la población IDO<sup>neg</sup> no hay presencia de IDO, este fenómeno no podría ocurrir. La expresión de CD86 podría estar contribuyendo a un ambiente inhibitorio en el caso de que tuviera como receptor a CTLA-4. Sin embargo, se encontró que la expresión de CD86 es baja en comparación con la expresión de CD274, este patrón de expresión es encontrado en CDt (Morelli et al, 2007).

Las moléculas indicadoras de maduración: CCR7 (migración a ganglio) y MHCII (presentación del antígeno) tienen expresiones diferentes (Figura 11). Por un lado, CCR7 tiene una expresión baja en las tres poblaciones, pero más alta en la población IDO<sup>high</sup>, aunque sin diferencia significativa. Posiblemente incrementa su expresión en la población IDO<sup>high</sup>, ya que es necesario que las CD migren a las áreas de las células T en ganglios para inducir tolerancia en células T. Posiblemente, los niveles de expresión de CCR7 se mantienen bajos, en general, ya que en trabajos como el de Ato et al (2002) se ha encontrado que la expresión de IL-10 inhibe la expresión de CCR7. En el presente trabajo se encontraron niveles intermedios de expresión de IL-10 en un alto porcentaje de células (Figuras 10 y 12). Por otro lado, la expresión de MHCII es baja en la población IDO<sup>neg</sup>, intermedia en la población IDO<sup>dim</sup> y alta en la población IDO<sup>high</sup>. En las poblaciones IDO<sup>neg</sup> e IDO<sup>dim</sup>, concuerda con los resultados de las moléculas coestimuladoras y de CCR7, ya que se mantiene un fenotipo inmaduro en todos los casos. Al no expresar grandemente el MHCII, estas células no son capaces de interactuar con células T, por lo tanto, no pueden producir ningún tipo de respuesta, tolerogénica o inmunogénica, ya que presentan un fenotipo inmaduro, el cual podría activarse positivamente en caso de un estímulo inflamatorio como antígenos ó citocinas inflamatorias (Reis e Sousa, 2004). Sin embargo, el fenotipo semimaduro de la población IDO<sup>high</sup> es capaz de inducir una respuesta tolerogénica al producir anergia y supresión de células T (Kim et al, 2006) debido a la propia expresión de IDO. Además, ésta misma población IDO<sup>high</sup>, es capaz de establecer una señal primaria con las células T, ya que mantiene altos niveles de expresión de MHCII y producir una tolerancia mediante señales coinhibidoras.

Para confirmar el fenotipo de CD tolerogénicas inducidas por IDO, se midió la expresión de CD273, CD274 e IL-10. Los niveles de CD273 se mantuvieron bajos en las poblaciones IDO<sup>neg</sup> e IDO<sup>dim</sup> e intermedios en la población IDO<sup>high</sup>. Éste incremento de CD273 en la población IDO<sup>high</sup> (aunque poco) podría resultar en una señalización negativa que produzca tolerancia a través de la formación de células Treg ya que, como lo indican Wölfle et al (2011), se necesita una alta expresión para observar este tipo de efectos inhibidores en CD. Por otro lado, los niveles de expresión de CD274 se mantuvieron intermedios en un alto porcentaje de células en las tres poblaciones, aunque en la población IDO<sup>neg</sup> su expresión fue menor, pero sin diferencia significativa (Figuras 10 y 12). Se ha observado que la expresión de CD274 aumenta cuando las CD son expuestas al GM-CSF (Bhattacharya et al, 2011), lo cual podría significar que la exposición al GM-CSF durante el proceso de diferenciación, induce la expresión de CD274 y por eso se expresa casi igual en las tres poblaciones. Estos dos resultados indican que la señal secundaria ó coseñal que podría estar mandando la población IDO<sup>+</sup> a las células T es de coinhibición. En este caso, para que la coseñal sea efectiva es importante que exista una señal primaria dada por el MHCII, por lo tanto, las poblaciones IDO<sup>neg</sup> e IDO<sup>dim</sup>, aunque positivas para CD274, no podrían ser tolerogénicas ya que no presentan altos niveles de MHCII, a diferencia de lo que ocurre con la población IDO<sup>high</sup>, aunado con la baja o nula expresión de IDO. La secreción de IL-10 es importante en la tolerancia periférica ya que suprime la producción de citocinas proinflamatorias y se induce un fenotipo Treg, en células T (Asadullah et al, 2003). En este trabajo, se encontró que la expresión de IL-10 aumenta en la población IDO<sup>high</sup> en comparación con las otras dos poblaciones donde su expresión es baja. Esto significa que, además de entregar señales secundarias coinhibidoras, las CD IDO<sup>high</sup> son capaces de inducir tolerancia por medio de citocinas antiproliferativas como IL-10.

## CONCLUSIONES

A partir de este trabajo se puede concluir que:

1. La expresión alta de IDO esta directamente relacionada con la expresión de un fenotipo tolerogénico en CD *in vitro*, aunque esta relación no depende necesariamente de la modulación de este fenotipo por IDO.
2. La expresión de IDO no se modifica aun cuando se adicionan inductores de esta enzima al medio de cultivo.
3. En este trabajo se encontraron y compararon tres poblaciones de células dendríticas: IDO<sup>neg</sup>, IDO<sup>dim</sup> e IDO<sup>high</sup>. Se observó que la población IDO<sup>neg</sup> (negativa a IDO) presenta un fenotipo inmaduro, incapaz de inducir alguna respuesta inmunológica (ya sea positiva o negativa) de acuerdo a este fenotipo y que la población IDO<sup>dim</sup> (baja expresión de IDO) tiene un fenotipo similar al de la población IDO<sup>neg</sup>. Por otra parte, la población IDO<sup>high</sup> (alta expresión de IDO) presenta un fenotipo semimaduro y tolerogénico capaz de inducir tolerancia por tres vías: coseñales inhibitoras, citocinas antiproliferativas y activación de IDO.
4. Además de éstas poblaciones, se encontró la población de CD tolerogénicas CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>, la cual también tiene una correspondencia cuando IDO se expresa en las CD.

## PERSPECTIVA

Estudios mas profundos deberán hacerse para elucidar el motivo por el cual existe una relación entre la expresión de IDO a altas concentraciones y un fenotipo tolerogénico en CD *in vitro*. Sin embargo, las poblaciones de CD IDO<sup>high</sup> y CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>, encontradas en este trabajo, podrían ser utilizadas en vacunas en contra de enfermedades como cáncer o autoinmunes, en las que la tolerancia periférica es un factor crucial en el desarrollo de la enfermedad.



## LITERATURA CITADA

Akira Shizuo, Uematsu Satoshi, Takeuchi Osamu, Pathogen recognition and Innate immunity, 2006, Cell, Vol. 124, 783-801pp.

Asadullah K., Sterry W., Volk H.D., Interleukin-10 therapy: review of a new approach, 2003, Pharmacological Reviews, Vol. 55, 241-269pp.

Ato Manabu, Stäger Simona, Engwerda Christian R., Kaye Paul M., Defective CCR7 expresison on dendritic cells contributes to the development of the visceral leishmaniasis, 2002, Nature Immunology, Vol. 3, 1185-1191pp.

Austin Christopher Jonathan Daraius, Mailu B. M., Maghzal G. J., Sánchez-Pérez A., Rahlfs S., Zocher K., Yuasa H. J., Arthur J. W., Becker K., Stocker R., Hunt N. H., Ball H. J., Biochemical characteristics and inhibitor selectivity of mouse indoleamine 2,3-dioxygenase, 2010, Amino Acids, Vol. 39, 565-578pp.

Banchereau Jacques, Briere Francine, Caux Christophe, Davoust Jean, Lebecque Serge, Liu Yong-Jun, Pulendran Bali, Palucka Karolina, Immunobiology of dendritic cells, 2000, Annual Review of Immunology, Vol. 18, 767-811pp.

Bhattacharya Palash, Gopisetty Anupama, Ganesh Balaji B., Sheng Jian Rong, Prabhakar Bellur, GM-CSF-induced, bone-marrow-derived dendritic cells can expand natural Tregs and induce adaptive Tregs by different mechanisms, 2011, Journal of Leukocyte Biology, Vol. 89, 235-249pp.

Bozinovski Steven, Jones Jessica E., Vlahos Ross, Hamilton John A., Anderson Gary P., Granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor (GM-CSF) regulates lung innate immunity to lipopolysaccharide through Akt/Erk of NFκB and AP-1 *in vivo*, 2002, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 277, 42808-42814pp.

Crawford Alison, Wherry E. John, The diversity of costimulatory and inhibitory receptor pathways and the regulation of antiviral T cell responses, 2009, Current Opinion in Immunology, Vol. 21, 179-186pp.

Dixon Garth L.J., Newton Phillipa J., Chain Benjamin M., Katz David, Andersen Svein Rune, Wong Simon, van der Ley Peter, Klein Nigel, Callard Robin E., Dendritic cell activation and cytokine production induced by group B *Neisseria meningitidis*: Interleukin-12 production depends on lipopolysaccharide expression in intact bacteria, 2001, Infection and Immunity, Vol. 69, 4351-4357pp.

Ebner Karin, Bandion Alexander, Binder Bernd R., de Marin Rainer, Schmid Johannes A., GMCSF activates NF-κB via direct interaction of the GMCSF receptor with IκB kinase β, 2003, Blood Journal, Vol. 102, 192-199pp.

Feldmann Marc, Steinmann Lawrence, Design of effective immunotherapy for human autoimmunity, 2005, Nature, Vol. 435, 612-619pp.

Fernández-Ponce Cecilia, Hernández-Martínez Juan David, Silvera-Redondo Carlos; Ctla-4, una molécula que inhibe la activación de los linfocitos T, 2006, Salud Uninorte, Vol. 22, 168-181pp.

Ganesh Balaji B., Cheatem Donald M., Sheng Jian Rong, Vasu Chenthamarakshan, Prabhakar Bellur S., GM-CSF-induced CD11c+CD8a—dendritic cells facilitate FOXP3+ and IL-10+ regulatory T cell expansion resulting in suppression of autoimmune thyroiditis, 2009, *International Immunology*, Vol. 21, 269-282pp.

Gangi Eryn, Vasu Chenthamarakshan, Cheatem Donald, Prabhakar Bellur S., IL-10 producing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells play a critical role in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced suppression of experimental autoimmune thyroiditis, 2005, *The Journal of Immunology*, Vol. 174, 7006-7013pp.

Garavito Rodríguez Edgar, Rojas Adriana, Méndez Patarroyo Paúl, Iglesias Gamarra Antonio, Tolerancia inmunológica: ¿Por qué convivimos con nuestros tejidos?, 2002, *Revista Colombiana de Reumatología*, Vol. 9, 124-129pp.

Geissmann Frederic, Manz Markus G, Jung Steffen, Sieweke Michael H., Merad Miriam, Ley Klaus, Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells, 2010, *Science*, Vol. 237, 656-661pp.

Genbank, consultado en septiembre 2011, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3620>

Granucci Francesca, Zanoni Ivan, Feau Sonia, Capuano Giusy, Ricciardi-Castagnoli Paola, The regulatory role of dendritic cells in the immune response, 2004, *International Archives of Allergy and Immunology*, Vol. 134, 179-185pp.

Granucci Francesca, Zanoni Ivan, The dendritic cell life cycle, 2009, *Cell Cycle*, Vol. 8, 3826-3821pp.

Guo Feifan, Cavener Douglas R., The GCN2 eIF2 $\alpha$  kinase regulates fatty-acid homeostasis in the liver during deprivation of an essential amino acid, 2007, *Cell Metabolism*, Vol. 5, 103-114pp.

Hansen Guido, Hercus Timothy R., McClure Barbara J., Stomski Frank C, Dottore Mara, Powell Jason, Ramshaw Hayley, Woodcock Joanna M., Xu Yibin, Guthridge Mark, McKinstry William J., Lopez Angel F., Parker Michael W., The structure of the GM-CSF receptor complex reveals a distinct mode of cytokine receptor activation, 2008, *Cell*, Vol. 134, 496-507pp.

Hewitt Eric W., The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion, 2003, *Immunology*, Vol. 110, 163-169pp.

Hogquist Kristin A., Baldwin Troy A., Jameson Stephen C., Central tolerance: learning self-control in the thymus, 2005, *Nature Reviews Immunology*, Vol. 5, 772-782pp.

Hwang Shih Ling, Chung Nancy Pei-Yee, Chan Jacqueline Kwai-Yi, Lin Chen-Lung Steve, Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is essential for dendritic cell activation and chemotactic responsiveness to chemokines, 2005, *Cell Research*, Vol. 15, 167-175pp.

Igney Frederik H., Krammer Peter H., Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack, 2002, *Journal of Leukocyte Biology*, Vol. 71, 907-920pp.

Imir Nilüfer Gülmen, Gül Nasircilar Ayşe, AKÇA Hakan, Gelen Tekinalp, Ögüş Mehmet, Karaveli Seyda, Özeş Osman Nidai, IFN- $\gamma$ -mediated transcriptional induction of the IDO (Indoleamine 2,3-dioxygenase) gene requires activity of p68/PKR protein kinase, 2002, *Turkish Journal of Medical Sciences*, Vol. 32, 195-199pp.

Inaba Kayo, Inaba Muneo, Romani Nikolaus, Aya Hideki, Deguchi Masashi, Ikehara Susumu, Muramatsu Shigeru, Steinman Ralph M., Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with Granulocyte/Macrophage colony-stimulating factor, 1992, Journal of Experimental Medicine, Vol. 176, 1693-1702pp.

Janeway Charles A., Travers Paul, Walport Mark, Shlomchik Mark, Immunobiology, the immune system in health and disease, 2001, Garland Publishing, 5<sup>a</sup> ed., EUA, 732pp.

Jürgens Birgit, Hainz Ursula, Fuchs Dietmar, Felzmann Thomas, Heitger Andreas, Interferon- $\gamma$ -triggered indoleamine 2,3-dioxygenase competence in human monocyte-derived dendritic cells induces regulatory activity in allogenic T cells, 2009, Blood Journal, Vol. 114, 3235-3243pp.

Katz Jessica B., Muller Alexander J., Prendergast George C., Indoleamine 2,3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape, 2008, Immunological Reviews, Vol. 222, 206-221pp.

Kazemi Shirin, Papadopoulou Stavroula, Li Suiyang, Su Qiaozhu, Wang Shou, Yoshimura Akihiko, Matlashewski Greg, Dever Thomas E., Koromilas Antonis E., Control of  $\alpha$  subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 $\alpha$ ) phosphorylation by the human papillomavirus type 18 E6 oncoprotein: implications for eIF2 $\alpha$ -dependent gene expression and cell death, 2004, Molecular and Cellular Biology, Vol. 24, 3415-3429pp.

Kim R., Emi M., Tanabe k., Functional roles of immature dendritic cells in impaired immunity of solid tumour and their targeted strategies for provoking tumour immunity, 2006, Clinical and experimental immunology, Vol. 146, 189-196pp.

Klechevsky Eynav, Morita Rimpei, Liu Maochang, Cao Yanying, Coquery Sebastien, Thompson-Snipes LuAnn, Briere Francine, Chaussabel Damien, Zurawski Gerard, Palucka A. Karolina, Reiter Yoram, Banchereau Jaques, Ueno Hideki, Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells, 2008, Immunity, Vol. 29, 497-510pp.

Kondo Motonari, Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors, 2010, Immunological Reviews, Vol. 238, 37-46pp.

Kushwah Rahul, Hu Jim, Dendritic cell apoptosis: regulation of tolerance versus immunity, 2010, The Journal of Immunology, Vol. 185, 795-802pp.

Leitner Judith, Grabmeier-Pfistershammer Katharina, Steinberger Peter, Receptors and ligands implicated in human T cell costimulatory processes, 2010, Immunology Letters, Vol. 128, 89-97pp.

Lutz Manfred B., Suri Rakesh M., Niimi Masanori, Ogilvie Alexandra L.J., Kukutsch Nicole A., Rößner Susanne, Schuler Gerold, Austyn Jonathan M., Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo, 2000, European Journal of Immunology, Vol. 30, 1813-1822pp.

Maiwald S., Wehner R., Schmitz M., Bornhäuser M., Loeb S., Wassmuth R., IDO1 and IDO2 gene expression analysis by quantitative polymerase chain reaction, 2010, Tissue Antigens, Vol. 77, 136-142pp.

Mellor Andrew L., Munn David H., Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation?, 1999, Immunology Today, Vol. 20, 469-473pp.

- Mellor Andrew, Indoleamine 2,3-dioxygenase and regulation of T cell immunity, 2005, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 338, 20-24pp.
- Mellor Andrew L., Munn David H., Creating immune privilege: active local suppression that benefits friends, but protects foes, 2008, Nature Reviews Immunology, Vol. 8, 74-80pp.
- Miyasaka Masayuki, Tanaka Toshiyuki, Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas, 2004, Nature Reviews Immunology, Vol. 4, 360-370pp.
- Moffett John R., Namboodiri Ma Aryan, Tryptophan and the immune response, 2003, Immunology and Cell Biology, Vol. 81, 247-265pp.
- Morelli Adrian E., Thomson Angus W., Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance, 2007, Nature Reviews Immunology, Vol. 7, 610-621pp.
- Mueller Daniel L., Mechanisms maintaining peripheral tolerance, 2010, Nature Immunology, Vol. 11, 21-27pp.
- Muller Alexander J., DuHadaway James B., Scott Donover P, Sutanto-Ward Erika, Prendergast George C., Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the suppression gene *Bin1*, potentiates cancer chemotherapy, 2005, Nature Medicine, Vol. 11, 312-319pp.
- Murphy Kenneth, Travers Paul, Walport Mark, Janeway's Immunobiology, 2008, Garland Science, 7<sup>a</sup> ed., EUA, 887pp.
- Murugaiyan G., Martin S., Saha B., Levels of CD40 expression on dendritic cells dictate tumour growth or regression, 2007, Clinical and Experimental Immunology, Vol. 149, 194-202pp.
- Nishimura Hiroyuki, Honjo Tasuku, PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance, 2001, TRENDS in Immunology, Vol. 22, 265-268pp.
- Onai Nobuyuki, Manz Markus G., Schmid Michael A., Isolation of common dendritic cells progenitors (CDP) from mouse bone marrow, 2009, Dendritic Cells Protocols (Methods in molecular biology), Vol. 595, 195-203pp.
- Pallota Maria T., Orabona Ciriana, Volpi Claudia, Vacca Carmine, Belladonna Maria L., Bianchi Roberta, Servillo Giuseppe, Brunacci Cinzia, Calvitti Mario, Bicciato Silvio, Mazza Emilia M. C., Boon Luis, Grassi Fabio, Fioretti Maria C., Fallarino Francesca, Puccetti Paolo, Grohmann Ursula, Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells, 2011, Nature Immunology, Vol. 12, 870-878pp.
- Patterson S., Gross J., Bedford P., Knight S.C., Morphology and phenotype of dendritic cells from peripheral blood and their productive and non-productive infection with human immunodeficiency virus type 1, 1991, Immunology, Vol. 72, 361-367pp.
- Pérez-Flores V., Guardo A.C., Rossi N.E., Recio M.J., Reiné J., Regueiro J.R., El complejo TCR/CD3: especificidad con flexibilidad, 2006, Inmunología, Vol. 25, 50-56pp.
- Platt Craig D., Ma Jessica K., Chalouni Cécile, Ebersold Melanie, Bou-Reslan Hani, Carano Richard A.D., Mellman Ira, Delamarre Léila, Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens, 2010, Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol. 107, 4287-4292pp.

- Prendergast G.C., Immune escape as a fundamental trait of cancer: focus on IDO, 2008, *Oncogene*, Vol. 27, 3889-3900pp.
- Quarto R., Bianchi G., Derubeis A., Mastrogiacomo M., Muraglia A., Cancedda R., Bone Marrow Stromal Cells: Cell biology and clinical applications, 2002, *European Cells and Materials*, Vol. 4, 28p.
- Reis e Sousa Caetano, Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity, 2004, *Current Opinion in Immunology*, Vol. 16, 21-25pp.
- Rocha Nuno, Neefjes Jacques, MHC class II molecules on the move for successful antigen presentation, 2008, *The European Molecular Biology Organization Journal*, Vol. 27, 1-5pp.
- Rock Kenneth L., Shen Lianjun, Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance, 2005, *Immunological Reviews*, Vol. 207, 166-183pp.
- Ruddon Raymond W., Cancer Biology, 2007, Oxford University Press, 4<sup>a</sup> ed., EUA, 530pp.
- Rutella Sergio, Danese Silvio, Leone Giuseppe, Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age, 2006, *Blood Journal*, Vol. 108, 1435-1440pp.
- Sakaguchi Shimon, Yamaguchi Tomoyuki, Nomura Takashi, Ono Masahiro, Regulatory T cells and immune tolerance, 2008, *Cell*, Vol. 133, 775-787pp.
- Sato Noriko, Sakamaki Kazuhiro, Terada Naohiro, Arai Ken-ichi, Miyajima Atsushi, Signal transduction by the high-affinity GM-CSF receptor: two distinct cytoplasmic regions of the common  $\beta$  subunit responsible for different signaling, 1993, *The European Molecular Biology Organization Journal*, Vol. 12, 4181-4189pp.
- Scheler Marina, Wenzel Joerg, Tüting Thomas, Takikawa Osamu, Bieber Thomas, von Bubnoff Dagmar, Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), the antagonist of type I interferon-driven skin inflammation?, 2007, *Immunopathology and infectious disease*, Vol. 171, 1936-1943pp.
- Schroder Kate, Hertzog Paul J., Ravasi Timothy, Hume David A., Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions, 2004, *Journal of Leukocyte Biology*, Vol. 75, 163-189pp.
- Shi Yufang, Liu Catherine H., Roberts Arthur I., Das Jyoti, Xu Guangwu, Ren Guangwen, Zhang Yingyu, Zhang Liying, Yuan Zeng Rong, William Tan Hung Sheng, Das Gobardhan, Devadas Satish, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know, 2006, *Cell Research*, Vol. 16, 126-133pp.
- Scott Grant N., DuHadaway James, Pigott Elizabeth, Ridge Natalie, Prendergast George C., Muller Alexander J., Mandik-Nayak Laura, The immunoregulatory enzyme IDO paradoxically drives B cell-mediated autoimmunity, 2009, *The Journal of Immunology*, Vol. 182, 7509-7517pp.
- Seliger Barbara, Marincola Francesco M., Ferrone Soldano, Abken Hinrich, The complex role of B7 molecules in tumor immunology, 2008, *Trends in Molecular Medicine*, Vol. 14, 550-559pp.
- Sheng Kuo-Ching, Pietersz Geoff A., Wright Mark D., Apostolopoulos, Dendritic cells: Activation and Maturation: applications for cancer immunotherapy, 2005, *Current Medicinal Chemistry*, Vol. 12, 1783-1800pp.

- Steinman Ralph M., Hawiger Daniel, Nussenzweig Michel C., Tolerogenic dendritic cells, 2003, Annual Review of Immunology, Vol. 21, 685-711pp.
- Stoitzner Patrizia, Stingl Georg, Merad Miriam, Romani Nikolaus, Langerhans Cells at the interface of medicine, science, and industry, 2010, Journal of Investigative Dermatology, Vol. 130, 331-335pp.
- Strobl Herbert, Riedl Elisabeth, Scheinecker Clemens, Bello-Fernandez Concha, Pickl Winfried F., Rappersberger Klemens, Majdic Otto, Knapp Walter. TGF-PI Promotes In Vitro Development of Dendritic Cells from CD34+ Hemopoietic Progenitors, 1996, The Journal of Immunology, Vol. 157, 1499-1507pp.
- Sugimoto Hiroshi, Oda Shun-ichiro, Otsuki Takashi, Hino Tomoya, Yoshida Tadashi, Shiro Yoshitsugu, Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: Cathalytic mechanism of O<sub>2</sub> incorporation by a heme-containing dioxygenase, 2006, Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol. 103, 2611-2616pp.
- Sun Ting, Chen Xiang-Hua, Tang Zheng-De, Cai Jiong, Wang Xiao-Yan, Wang Shih-Chen, Li Zhao-Long, Novel 1-alkyl-tryptophan derivatives downregulate IDO1 and IDO2 mRNA expression induced by interferon-gamma in dendritic cells, 2010, Molecular and Cellular Biochemistry, Vol. 342, 29-34pp.
- Szántó Sándor, Koreny Tamás, Katalin Mikecz, Glant Tibor T., Zsekanecz Zoltán, Varga John, Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan catabolism accelerates collagen-induced arthritis in mice, 2007, Arthritis Research and Therapy, Vol. 9.
- Tan Yuen-Fen, Leong Chooi-Fun, Cheong Soon-Keng, Observation of dendritic cell morphology under light, phase-contrast or confocal laser scanning microscopy, 2010, The Malaysian Journal of Pathology, Vol. 32, 97-102pp.
- Thangavelu G., Parkman J.C., Ewen C.L., Uwiera R.R.E., Baldwin T.A., Anderson C.C., Programmed death-1 is required for systemic self-tolerance in newly generated T cells during the establishment of immune homeostasis, 2011, Journal of autoimmunity, Vol.36, 301-312pp.
- Tirapu Iñigo, Huarte Eduardo, Guiducci Cristiana, Arina Ainhoa, Zaratiegui Mikel, Murillo Oihana, Gonzalez Alvaro, Berasain Carmen, Berraondo Pedro, Fortes Puri, Prieto Jesús, Colombo Mario P., Chen Lieping, Melero Ignacio, Low surface expression of B7-1 (CD80) is an immunoescape mechanism of colon carcinoma, 2006, Cancer Research, Vol. 66, 2442-2450pp.
- van Oers Nicolai, Weiss Arthur, The Syk/ZAP-70 protein tyrosine kinase connection to antigen receptor signaling processes, 1995, Seminar in Immunology, Vol. 7, 227-236pp.
- Vignali Dario A.A., Collison Lauren W., Workman Creg J., How regulatory T cells work, 2008, Nature Reviews Immunology, Vol. 8, 523-532pp.
- Wee Janet Lye-Keng, Christiansen Dale, Li Yu-Qin, Boyle William, Sandrin Mauro S., Suppression of cytotoxic and proliferative xenogeneic T-cell response by transgenic expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, 2008, Immunology and Cell Biology, Vol.86, 460-465pp.
- Welsch Ulrich, Histología, 2008, Panamericana, 2ª ed., USA, 676pp.
- Wingender Gerhard, Garbi Natalio, Schumak Beatrix, Jüngerkes Frank, Endl Elmar, von Bubnoff Dagmar, Steitz Julia, Striegler Jörg, Moldenhauer Gerd, Tüting Thomas, Heit Antje, Huster Katharina M., Takikawa Osamu, Akira Shizuo, Busch Dirk H., Wagner Hermann, Hämmerling Günter J., Knolle Percy A., Limmer Andreas, Systemic application of CpG-rich DNA suppresses

adaptive T cell immunity via induction of IDO, 2006, European Journal of Immunology, Vol. 36, 12-20pp.

Wölfle Sabine J., Strebovsky Julia, Bartz Holger, Sähr Aline, Arnold Caroline, Kaiser Claus, Alexander H., Heeg Dalpke, Heeg Klaus, PD-L1 expression on tolerogenic APCs is controlled by STAT-3, 2011, European Journal of Immunology, Vol. 41, 413-424pp.

Zhu Yuwen, Yao Sheng, Chen Lieping, Cell surface signaling molecules in the control of immune responses: a tide model, 2011, Immunity, Vol. 34, 466-478pp.

Zia U. A. Mollah, Setsuya Aiba, Satoshi Nakagawa, Masahiro Hara, Hideaki Manome, Masato Mizuashi, Tomoyuki Ohtani, Yumiko Yoshino, Hachiro Tagami. Macrophage Colony-stimulating Factor in Cooperation with Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Induces the Differentiation of CD34<sup>+</sup> Hematopoietic Progenitor Cells Into Langerhans Cells Under Serum-free Conditions Without Granulocyte-macrophage Colony-stimulating Factor, 2003, Journal of Investigative Dermatology, Vol. 120, 256-265pp.

Zimmerman L.M., Vogel L.A., Bowden R.M., Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective, 2010, The Journal of Experimental Biology, Vol. 213, 661-671pp.

Zou Gang-Ming, Hu Wen-Yang, LIGHT regulates CD86 expression on dendritic cells through NF- $\kappa$ B, but not JNK/AP-1 signal transduction pathway, 2005, Journal of cellular physiology, Vol.205, 437-443pp.