

Inducción de inmunotolerancia sistémica como estrategia preventiva o terapéutica para trastornos degenerativos que cursan con inflamación crónica

Systemic immunetolerance induction as a preventive or therapeutic strategy for degenerative disorders that occur with chronic inflammation

Ana Laura Pelayo Gómez*, Diana Karina Talavera Carrillo*, Lorena Martínez Alcantar*, Jorge Marcelino Secundino*, Jonhatan Uriel Pineda Salazar*, Alma Lilia Fuentes Farías*, Esperanza Meléndez Herrera*

RESUMEN

El ojo es capaz de regular la respuesta inflamatoria activando una forma de tolerancia específica y sistémica para antígenos que son inoculados en su interior. Esta capacidad puede ser aprovechada para modular la respuesta inflamatoria en enfermedades degenerativas. Sin embargo, se desconoce el tiempo de permanencia de la inmunotolerancia y si ésta depende de la edad de inducción. El objetivo es evaluar la permanencia de inmunotolerancia a albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés). Inoculamos BSA en la cámara anterior del ojo de ratas juveniles y adultas. Estos animales fueron posteriormente inmunizados con BSA para evaluar la inmunotolerancia sistémica y específica al antígeno a lo largo del tiempo. El resultado fue que tanto ratas juveniles como adultas fueron tolerizadas a BSA ($t_{(5)}$:3.102, $p < 0.05$; $t_{(8)}$:3.278, $p < 0.001$) y este estado se mantuvo al menos hasta los cinco meses posinducción en ratas juveniles ($t_{(7)}$:11.704, $p < 0.001$) y hasta los 4 meses en ratas adultas ($t_{(5)}$:3.278, $p < 0.05$).

ABSTRACT

The eye is able to regulate the inflammatory response by activating a specific and systemic tolerance to antigens that are inoculated within it. This ability can be exploited to regulate the inflammatory response in degenerative diseases. However, the time during which this state of immunotolerance is maintained and whether its permanence depends on the age of induction is unknown to this date. To evaluate the persistence of immune tolerance to bovine serum albumin (BSA). BSA was inoculated in the anterior chamber of the eye. The rats were subsequently immunized with BSA to assess specific immune tolerance to the antigen throughout time. The results show that both juvenile and adult rats were tolerated to BSA ($t_{(5)}$:3.102, $p < 0.05$; $t_{(8)}$:3.278, $p < 0.001$) and this state remained for five months post-induction in juvenile rats ($t_{(7)}$:11.704, $p < 0.001$) and for 4 months in adult rats ($t_{(5)}$:3.278, $p < 0.05$).

Recibido: 10 de abril de 2015
Aceptado: 25 de mayo de 2015

Palabras clave:

Desviación inmunitaria asociada a la cámara anterior; privilegio inmunológico.

Keywords:

Anterior chamber associated immune deviation; immune privilege.

Cómo citar:

Pelayo Gómez, A. L., Talavera Carrillo, D. K., Martínez Alcantar, L., Secundino, J. M., Pineda Salazar, J. U., Fuentes Farías, A. L. & Meléndez Herrera, E. (2015). Inducción de inmunotolerancia sistémica como estrategia preventiva o terapéutica para trastornos degenerativos que cursan con inflamación crónica. *Acta Universitaria*, 25(NE-1), 39-43. doi: 10.15174/au.2015.761

INTRODUCCIÓN

Existen tejidos inmunoprivilegiados como el ojo, el útero y los testículos, los cuales son capaces de autorregular la respuesta inflamatoria a fin de preservar sus funciones (Hori, 2008). La ventaja evidente del privilegio inmunológico al organismo es que la respuesta inmunológica "normal" ante un patógeno esté tan atenuada que los tejidos que no tienen capacidad para regenerar (por ejemplo: la retina, el cerebro) estén protegidos del daño colateral (D'Orazio & Niederkorn, 1998; Forrester, Xu, Lambe & Cornall, 2008). El ojo es capaz de generar un estado de inmunotolerancia específica y sistémica que comprende fases secuenciales en el timo y el bazo. Esta respuesta inicia cuando el antígeno soluble es captado por macrófagos que actúan como células presentadoras de antígeno y lo llevan a través de la malla trabecular hacia el torrente sanguíneo, y después de un desvío hacia el timo terminan su viaje en el bazo (Marinovic, 2010). Dentro del bazo, los macrófagos interactúan con linfocitos T provenientes del timo, así como con linfocitos B de la zona

* Laboratorio de Ecofisiología Animal, Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales (INIRENA), Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Avenida San Juanito Itzicuaro s/n, Nueva Esperanza, Morelia, Michoacán, México, C.P. 58330. Tel.: (443) 333 04 89. Correo electrónico: any.lun@gmail.com

marginal para inducir células T reguladoras específicas de antígeno, las cuales limitan la respuesta inmunológica Th1 y Th2 tanto local como sistémica (Hori, 2008). Los macrófagos liberan citocinas como el factor de crecimiento transformante (TGF, por sus siglas en inglés) β al bazo y al timo para favorecer el desarrollo de células T reguladoras aferentes CD4+ y eferentes CD8+. Las células aferentes inhiben la respuesta inmunológica en la etapa de sensibilización, mientras que las eferentes requieren de una exposición previa al antígeno para inhibir la respuesta inflamatoria característica de la hipersensibilidad de tipo retrasado (Forrester *et al.*, 2008). Las citocinas como TGF- β también contribuyen al mantenimiento de privilegio inmunológico debido a que inhiben directamente la producción de citocinas pro-inflamatorias como interleucina (IL)-12, además de que inducen la producción preferente de IL-10. A su vez, IL-10 regula a la baja la producción de un gran número de citocinas pro-inflamatorias, tales como IL-1 β , 6, 12, 18, interferón γ (INF- γ) y el factor de necrosis tumoral α (FNT- α) (D'Orazio & Niederkorn 1998). Al final, el humor acuoso, bazo, timo y las células del sistema inmunológico que de estas estructuras derivan favorecen la supresión de la respuesta tipo Th1 y Th2, y son absolutamente necesarias para la inducción de inmunotolerancia asociada al ojo (Bhowmick, Clark, Brocke & Cone, 2011; Biros, 2008; Cone & Pais, 2009; Hori, 2008; Niederkorn & Kaplan, 2007; Niederkorn, 2009).

Un gran espectro de enfermedades degenerativas está asociado con inflamación crónica. Tal es el caso de patologías neurodegenerativas como la esclerosis amiotrófica lateral y las enfermedades de Parkinson y Alzheimer, así como de algunas otras patologías periféricas como osteoartritis y artritis reumatoide (Bhowmick *et al.*, 2011; Farooq, Kumar & Ashour, 2014). En principio, la inflamación es un mecanismo homeostático que se dispara para 1) eliminar los patógenos invasores o restos celulares provenientes de muerte celular y 2) promover la reparación tisular y la angiogénesis. Sin embargo, una inflamación crónica no resuelta puede evitar la reparación del tejido y extender la lesión hacia zonas aledañas sanas. La inflamación crónica puede ser el resultado de inadecuados mecanismos de regulación y de la persistencia de proteínas antigénicas derivadas del tejido lesionado. En conjunto, estos mecanismos conducen al establecimiento de una respuesta autoinmune contra los propios constituyentes celulares que ahora son reconocidos como antígenos. Esta respuesta de autoinmunidad es básicamente mediada por células del sistema inmunológico adaptativo (Bhowmick *et al.*, 2011; Harrison & Hafler, 2000).

Tomando en consideración que la respuesta inflamatoria asociada a cualquier patología es bifuncional (genera efectos positivos que favorecen la homeostasis y la reparación tisular, pero también efectos negativos si no se resuelve adecuadamente), es nuestro principal interés desarrollar una estrategia de inmunomodulación que instruya al sistema inmunológico de ratas a tolerar a autoantígenos, evitando las fases de inflamación descontrolada y el establecimiento de una patología autoinmune secundaria a la enfermedad neurodegenerativa. Un elemento fundamental para garantizar la posible eficacia de este tratamiento es el mantenimiento de la inmunotolerancia a lo largo de la vida del animal. Múltiples estudios en los que se genera una inmunotolerancia específica y sistémica a diversos antígenos han sido desarrollados en roedores (Farooq & Ashour, 2013; 2014). Algunos de estos estudios han destacado la relevancia de la inducción en etapas tempranas de la vida, en tanto los animales con un sistema inmunológico inmaduro parecen requerir concentraciones menores de antígeno y un menor número de aplicaciones para mantener el estado de inmunotolerancia durante periodos más prolongados de tiempo (Siegrist, 2001). En contraposición, es más difícil inducir inmunotolerancia en adultos, pues se requieren concentraciones más altas, mayor número de exposiciones y a menudo la tolerancia es parcial y decae en poco tiempo (Zouali, 2001). Hasta el momento, la permanencia de la inmunotolerancia específica de antígeno inducida mediante la inoculación de dicho antígeno en la cámara anterior no ha sido evaluada, y frecuentemente se asume de manera errónea que es permanente. Por ello, la presente propuesta tiene como objetivo general evaluar la permanencia de la inmunotolerancia específica para la proteína albúmina de suero bovino (BSA, proteína capaz de desencadenar una respuesta antigénica), durante el primer año posinducción en ratas hembra de la cepa Wistar. Debido a que ha sido ampliamente reportado que la inducción de inmunotolerancia a través de la inoculación del antígeno en la cámara anterior del ojo inhibe la respuesta Th1, en este trabajo se evaluará su permanencia mediante la inflamación en oreja en pruebas de hipersensibilidad retardada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Inoculación del antígeno en la cámara anterior del ojo

Para inducir inmunotolerancia a BSA, un volumen de 10 μ L de la proteína (7.5 μ g/ μ L) fue inoculado en ambos ojos de ratas juveniles (al mes posnatal) o adultas

(cuatro meses posnatales). El grupo control fue inoculado en ambos ojos con vehículo (buffer salino de fosfatos [PBS, por sus siglas en inglés]). Para llevar a cabo la inyección, las ratas fueron anestesiadas con un coctel de ketamina/xilacina (70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal, respectivamente) vía intraperitoneal (i.p). La inyección en la cámara anterior se realizó con una jeringa Hamilton, liberando el volumen total de la solución en dos minutos, bajo microscopio estereoscópico (Niederhorn & Kaplan, 2007). Durante todo el procedimiento, los ojos de las ratas fueron mantenidos hidratados con solución salina al 0.9%.

Pruebas de hipersensibilidad retardada

Para evaluar la inducción y mantenimiento del estado de inmunotolerancia sistémica a BSA, se realizó la prueba de hipersensibilidad retardada, que consiste en una fase de sensibilización y una de reto. La sensibilización se llevó a cabo siete días después de la inoculación en la cámara anterior del ojo. Para este procedimiento, las ratas fueron nuevamente anestesiadas, tal como se describe previamente, se rasuraron en la región interescapular y se inyectaron con un volumen de 200 μL de BSA con adyuvante completo de Freund (1:1 BSA: 250 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ de vehículo; adyuvante 100 μl) vía intradérmica (i.d.) con jeringa de tuberculina. El reto se realizó siete días después de la sensibilización. Nuevamente, las ratas fueron anestesiadas y el grosor de sus orejas se midió con un micrómetro para establecer la línea base. Todos los animales recibieron una inyección i.d. de 10 μL de BSA (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en el pabellón de la oreja izquierda y 10 μL de vehículo en la derecha. 24 h y 48 h más tarde, el grosor de las orejas fue medido nuevamente, y a estos últimos valores le fueron restados los de la línea base para obtener un índice de inflamación por oreja (delta de inflamación, Δ).

Para el análisis estadístico se usaron los valores Δ , los cuales fueron promediados y comparados mediante el paquete estadístico *SigmaStat* 2007. Los datos primero se sometieron a la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y la de homocedasticidad de Levene. Una vez comprobada la normalidad y varianza de los datos se utilizó una T de Student para comparar las Δ entre los grupos.

Permanencia de immuno-tolerancia

Para la evaluación de la permanencia de la inmunotolerancia a lo largo del tiempo, se repitieron los procedimientos de sensibilización y reto.

RESULTADOS

Se comenzaron los estudios de inducción de inmunotolerancia con ratas adultas. Los resultados de la prueba de hipersensibilidad retardada muestran una respuesta inflamatoria disminuida en ratas del grupo BSA en comparación con animales del grupo control a los 15 días posinducción ($t_{(5)}: 3.102, p < 0.05^*$, figura 1A). Esta diferencia se mantuvo a los cuatro meses cuando se realizó la segunda evaluación ($t_{(5)}: 3.278, p < 0.05^*$, figura 1B).

Este mismo diseño experimental fue repetido en animales juveniles, con el fin de comparar el tiempo que permanece la inmunotolerancia inducida en diferentes etapas de la ontogenia en ratas de la cepa Wistar. La evaluación 15 días posinoculación en estos animales muestra una respuesta inflamatoria disminuida en ratas del grupo BSA en comparación con animales del grupo control ($t_{(8)}: 3.278, p < 0.001$, figura 2A) con valores similares a los observados en adultos (figuras 1A vs. 2A). Basados en los resultados obtenidos en adultos, para los animales juveniles se decidió evaluar la inmunotolerancia a los cinco meses posinducción probando la idea de que la inmunotolerancia permanece al menos cuatro meses. Los resultados muestran que, efectivamente, las ratas juveniles conservan el estado de inmunotolerancia a BSA a los cinco meses posinducción ($t_{(7)}: 11.704, p < 0.001$, figura 2B). Sin embargo, los valores de inflamación mostrados en ambos grupos están muy por encima de los observados en todas las condiciones antes referidas.

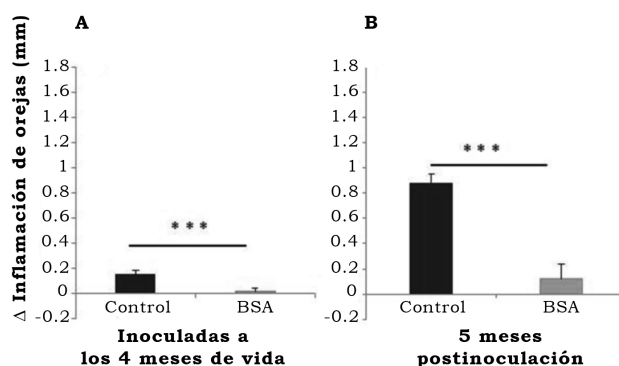


Figura 1. Permanencia de inmunotolerancia inducida por la proteína albúmina de suero bovino (BSA) inoculada en la cámara anterior de ratas adultas, medida mediante pruebas de hipersensibilidad retrasada. Las gráficas muestran la diferencia de inflamación en orejas (Δ) medida a las 24 h después del reto con respecto a la línea base. A) Evaluación posinducción. B) Evaluación a los cuatro meses posinducción. Se grafican promedios de inflamación \pm Desviación estándar (DESVEST). Los valores de $p < 0.05$ (*) y $p < 0.01$ (**) se consideraron significativos.

Fuente: Elaboración propia.

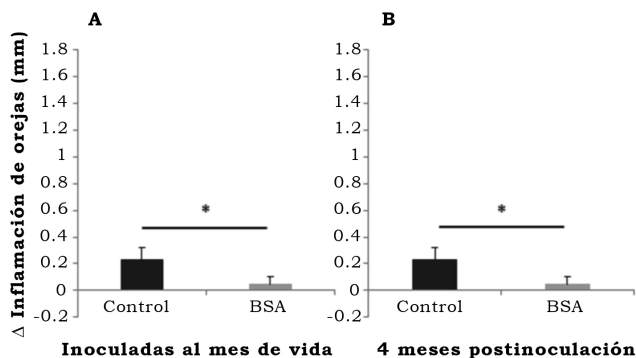


Figura 2. Permanencia de inmunotolerancia inducida por la proteína BSA inoculada en cámara anterior de ratas juveniles, medida mediante pruebas de hipersensibilidad retrasada. Las gráficas muestran la diferencia de inflamación en orejas (Δ) medida a las 24 h después del reto con respecto a la línea base. A) Evaluación posinducción. B) Evaluación a los cinco meses posinducción. Se grafican promedios de inflamación \pm DESVEST. Los valores de $p < 0.001$ *** se consideraron altamente significativos.

Fuente: Elaboración propia.

DISCUSIÓN

El principal interés es desarrollar una estrategia de inmunomodulación que instruya al sistema inmunológico de ratas a tolerar a autoantígenos evitando el establecimiento de inflamación crónica y la patología autoinmune secundaria. De ser eficiente, esta estrategia podrá ser empleada para modular procesos inflamatorios crónicos en un gran número de enfermedades neurodegenerativas. Un elemento fundamental para garantizar la eficacia de este tratamiento es el mantenimiento de la inmunotolerancia a lo largo de la vida del animal. Hasta el momento se desconoce el tiempo de permanencia del estado de inmunotolerancia y si su permanencia depende de la edad de inducción. Para evaluar estas incógnitas se inoculó BSA en la cámara anterior del ojo de ratas juveniles y adultas. Posteriormente se evaluó la inducción y permanencia de la inmunotolerancia específica para BSA mediante pruebas de hipersensibilidad retrasada en ambos grupos. Los resultados indican que es posible inducir inmunotolerancia sistémica con una sola exposición al antígeno en la cámara anterior en animales adultos no inmunodeprimidos, como ha sido descrito previamente en un modelo murino (Bhowmick *et al.*, 2011; Farooq & Ashour, 2013). Adicionalmente, los resultados muestran que este estado de inmunotolerancia permanece al menos cuatro meses posinducción en estos animales. Por otra parte, se encontró que en animales juveniles el estado de inmunotolerancia subsiste al menos hasta los cinco meses posinducción. En principio, estos resultados muestran que la inmunotolerancia es tan eficiente cuando se realiza en animales

juveniles como en animales adultos, en contraposición a lo reportado en la literatura (Siegrist, 2001; Zouali, 2001). Sin embargo, será necesario evaluar el momento exacto en el que la inmunotolerancia se pierde para ambos grupos, con el fin de determinar si la permanencia es mayor en animales juveniles. Además, será necesario evaluar la relevancia funcional de los niveles de inflamación observados a los cinco meses posinducción en animales juveniles para descartar el establecimiento de un estado patológico.

CONCLUSIONES

En conjunto, estos resultados permiten ser optimistas y proponer la inducción de inmunotolerancia como un mecanismo potencial para evitar la extensión de la patología y favorecer la reparación tisular en enfermedades degenerativas que cursen con inflamación crónica. Actualmente se induce inmunotolerancia específica de antígenos medulares como estrategia preventiva y terapéutica en el establecimiento de la enfermedad degenerativa secundaria a la lesión traumática espinal.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado con recursos provenientes del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt), núm. 180762, y de la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (CIC-UMSNH), núm. 108459. Alma Lilia Fuentes Fariás y Lorena Martínez Alcantar son becarias de Conacyt y Diana Karina Talavera Carrillo recibió apoyo de la CIC.

REFERENCIAS

- Bhowmick, S., Clark, R., Brocke, S. & Cone, R. (2011). Antigen-specific splenic CD4+ and CD81 regulatory T cells generated via the eye, suppress Experimental Autoimmune Encephalomyelitis either at the priming or at the effector phase. *International Immunology, Japanese Society for Immunology*, 23(2), 119-128.
- Biros, D. (2008). Desviación inmunitaria asociada a la cámara anterior. *Veterinary Clinics of the North America: Small Animal Practice*, 38(2), 309-321.
- Cone, R. & Pais, R. (2009). Anterior chamber-Associated Immune Deviation (ACAID): An Acute Response to Ocular Insult protects from Future Immune-Mediated Damage? *Ophthalmology and Eye Diseases*, 17(1), 33-40.
- D'Orazio, T. J. & Niederkorn, J. Y. (1998). A novel role for TGF-beta and IL-10 in the induction of immune privilege. *Journal of Immunology*, 160(5), 2089-2098.

- Farooq, S. M. & Ashour, H. M. (2013). Eye-Mediated Induction of Specific Immune Tolerance to Encephalitogenic Antigens. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 19(7), 503-510. doi:10.1111/J
- Farooq, S. M. & Ashour, H. M. (2014). *In vitro*-induced cell-mediated immune deviation to encephalitogenic antigens. *Brain, Behavior, and Immunity*, 35(1), 64-69.
- Farooq, S. M., Kumar, A. & Ashour, H. M. (2014). Eye-mediated immune tolerance to Type II collagen in arthritis-prone strains of mice. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18(12), 2512-2518.
- Forrester, J. V., Xu, H., Lambe, T. & Cornall, R. (2008). Immune privilege or privileged immunity? *Mucosal Immunology*, 1(5), 372-381.
- Harrison, L. C. & Hafler, D. (2000). Antigen-specific therapy for autoimmune disease. *Elsevier Science Current Opinion in Immunology*, 12(6), 704-711.
- Hori, J. (2008). Mechanisms of immune privilege in the anterior segment of the eye: what we learn from corneal transplantation. *Joculbiol dis inform*, 1(2-4), 94-100.
- Marinovic, M. A. (2010). Inmunología ocular. *Revista Chilena de Reumatología*, 26(3), 222-241.
- Niederhorn, J. H. (2009). Role of NKT cells in anterior chamber-associated immune deviation. *Expert Review of Clinical Immunology*, 5(2), 137-144.
- Niederhorn, J. Y. & Kaplan, H. J. (2007). *Immune Response and the Eye. Chemical Immunology and Allergy*. New York: Editorial: Basel, Karger.
- Siegrist, C. A. (2001). Neonatal and early life vaccinology. *Elsevier Science, Ltd. Vaccine*, 19(25-26), 3331-3346.
- Zouali, M. (2001). *Immunological Tolerance: Mechanisms. In Enciclopedia of Life Sciences*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd. Recuperado de <http://www.els.net>. doi: 10.1002/9780470015902.a0000950.pub3